

ÜBER DIE STANDARDISIERUNG UND
VEREINFACHUNG DER SPONTAN-
PAPIERFIBRINOLYSE (ELUATIONSMETHODE)

BRIGITTE SCHORER

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548328_0060

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. W. Seitz

Über die Standardisierung und Vereinfachung der Spontan-
papierfibrinolyse (Eluationsmethode)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
in der
gesamten Medizin
verfaßt
und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Brigitte Schorer
aus Donauwörth

München 1970

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. N. Goossens

Mitberichterstatter: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Prof. Dr. E. Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juni 1970



Meinen Tanten gewidmet, die mir das Studium
ermöglicht haben.

Herrn Professor Dr. N. Goossens danke ich
für die Überlassung des Themas und für die
wertvollen Anregungen zur Gestaltung dieser
Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

<u>Theoretischer Teil</u>	...	2
1. Einleitung	...	2
2. Definition der Fibrinolyse und Wirkungsmechanismus	...	3
3. Inhibitoren der Fibrinolyse	...	5
4. Aktivatoren der Fibrinolyse	...	6
5. Indikationen zur thrombolytischen Therapie	...	9
6. Meßmethoden	...	11
<u>Experimenteller Teil</u>	...	14
1. Verwendete Materialien und Geräte	...	14
2. Methode	...	15
3. Versuchsdurchführung	...	16
3.1 Testansatz und Inkubation	...	17
3.2 Wässerung und Trocknung	...	17
3.3 Färbung, Entfärbung und Trocknung	...	17
3.4 Photometrische Auswertung	...	18
3.5 Fehlerquellen	...	20
4. Versuche zur Spontanpapierfibrinolyse	...	21
4.1 Auswertung des Standard-Fibrinpapiers und Gegenüberstellung der Meßmethoden	...	22
4.2 Inkubation der mit Plasma getränkten Standard- Fibrinpapier-Streifen auf Glasplatten, sog. Glasplattenmethode	...	27
4.3 Inkubation der Standard-Fibrinpapier-Streifen im Plasma	...	30
4.4 Bestimmung der Lysequote von Plasmen gesunder Versuchspersonen und Marcumar-Patienten	...	34
4.5 Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase	...	37
4.6 Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase unter besonderer Berücksichtigung der Streptokinase-Resistenz	...	39
5. Zusammenfassung	...	49
6. Literaturverzeichnis	...	51
7. Lebenslauf	...	57

Theoretischer Teil

1. Einleitung

Die Einführung der Antikoagulantien brachte einen wesentlichen Fortschritt in der Therapie und Prophylaxe thromboembolischer Erkrankungen. Durch ihre Anwendung wurde die Gefahr embolischer Komplikationen geringer und die Bildung neuer Thromben weitgehend verhindert. Das "ideale" Ziel einer kausalen Therapie bereits bestehender Gerinnsel ist jedoch ihre Auflösung. Obwohl in letzter Zeit auch eine gewisse thrombolytische Wirkung des Heparins und der Heparinoide diskutiert wird, versprechen die Aktivatoren des körpereigenen fibrinolytischen Systems nach den bisherigen Erfahrungen bessere Erfolge.

Über die spontane Wiederauflösung von humanen Blutgerinnseln in vitro berichtete schon Denis (aus 1) im Jahre 1838. Auf ähnliche Beobachtungen wies Dastre (2) bei seinen Tierversuchen an Hunden hin. Von ihm stammt auch die Bezeichnung "Fibrinolyse". Die Aktivierung eines thermolabilen proteolytischen Ferments erreichten Denys und Marbaix (3) durch Zugabe von Chloroform zum Serum. Anfang des 20. Jahrhunderts fanden Delezenne und Pozerski (4), daß die durch Chloroform bewirkte proteolytische Aktivität des Hundeserums durch frisches, unbehandeltes Serum gehemmt wird. Sie führten diesen Effekt auf die Existenz eines Fibrinolyse-Inhibitors zurück, der durch Chloroform zerstört wird.

Neues Interesse für die Forschung auf dem Gebiet der Fibrinolyse erweckten die Untersuchungen von Tillett und Garner (5) im Jahre 1933. Sie entdeckten, daß Kulturfiltrate bestimmter hämolytischer Streptokokken eine Substanz enthalten, die eine rasche "Verflüssigung" des menschlichen Fibrins bewirkt. Milstone (1941) jedoch bewies, daß aus gereinigtem Fibrinogen gewonnenes Fibrin von den genannten Streptokokkenfiltraten nicht aufgelöst wurde (6). Die Lyse

trat erst ein, wenn er dem Testsystem Serunglobulin zusetzte. Christensen und MacLeod (7) konnten den Nachweis erbringen, daß das Kulturfiltrat der Streptokokken eine Kinase enthält, die das von Denys und Marbaix beschriebene proteolytische Ferment aus einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen, in das aktive Ferment Plasmin überführt. Sie bezeichneten diesen Aktivator als "Streptokinase". Nach den Versuchsergebnissen von Müllertz und Lassen (8) erwies sich der Wirkungsmechanismus der Streptokinase (SK) als sehr viel komplizierter, da ein "Proaktivator" existieren soll, der durch SK aktiviert wird.

Das sog. fibrinolytische System wurde in den letzten 20 Jahren genauer untersucht und der Mechanismus des Fibrinolysevorgangs weitgehend geklärt.

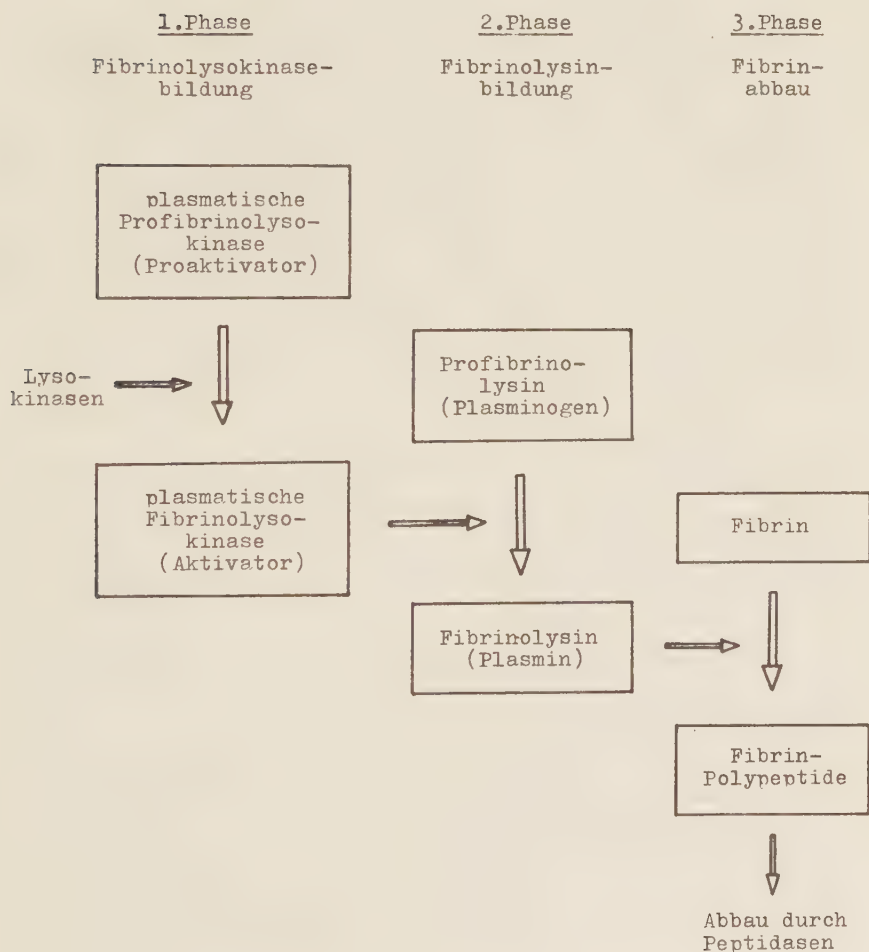
2. Definition der Fibrinolyse und Wirkungsmechanismus.

Unter Fibrinolyse versteht man die enzymatische Wiederauflösung von Fibringerinnseln. Das bei der Blutgerinnung und bei Entzündungen gebildete Fibrin wird durch das proteolytische Ferment Plasmin (synon. Fibrinolysin) in lösliche Fibrin-Polypeptide (9), sog. Splitterprodukte, gespalten.

Als Spontanfibrinolyse bezeichnet man die ohne medikamentöse Aktivierung im Organismus vorhandene oder auftretende Fibrinolyse. Normalerweise ist im menschlichen Blut nur eine geringe fibrinolytische Aktivität nachweisbar, da das Plasmin in einer inaktiven Vorstufe, dem Plasminogen (synon. Profibrinolysin), vorliegt und außerdem ein Überschuß an fibrinolysehemmenden Faktoren besteht (10). Unter bestimmten physiologischen und pathologischen Umständen erfolgt die Aktivierung des Plasminogens zu Plasmin durch sog. Fibrinolysokinasen (11, 12), wobei man zwischen der im Blut auftretenden plasmatischen und der z.B. bei Zellläsionen freiwerdenden zellulären Fibrinolysokinase unterscheidet. Die plasmatische Fibrinolysokinase soll durch Aktivierung der sog. Profibrinolysokinase, einem Proaktivator, entstehen.

Folgendes Schema soll den Fibrinolysevorgang nochmals veranschaulichen.

Schema der Blutfibrinolyse
nach Stamm (13)



3. Inhibitoren der Fibrinolyse

Spezifische, gegen das Plasmin (Antiplasmine) und gegen die Aktivatoren des Plasminogens (Antiaktivatoren) gerichtete Inhibitoren spielen bei der Regulation des fibrinolytischen Systems eine wichtige Rolle. Norman (14) konnte aus dem Plasma einen sofort wirkenden, hitzestabilen Inhibitor von einem progredient wirkenden temperaturemfindlichen Inhibitor trennen. Nach den Untersuchungen von Deutsch und Marschner (15) wird der Sofortinhibitor während der thrombolytischen Therapie (mit SK allein und in Kombination mit Plasmin) vermindert. Das progressive Antiplasmin zeigt keine charakteristischen Veränderungen. Der Sofortinhibitor ist identisch mit dem Alpha-2-Makroglobulin und der Progressivinhibitor mit dem Alpha-1-Globulin (16). Die genannten Serum-Inhibitoren wurden durch die Fibrinagar-Elektrophorese dargestellt.

Ein sofort wirksames Antiplasmin wurde auch in den Thrombozyten nachgewiesen (17), das nach neueren Ergebnissen etwa 3% der gesamten Antiplasminaktivität ausmachen soll (18).

Weitere Inhibitoren sind aus Gewebsextrakten von Pankreas (19), Rinderlunge (20), Parotis, Leber und Milz isoliert worden. Die Wirkung dieser Polypeptide beruht auf der Fähigkeit mit proteolytischen Fermenten, wie Trypsin und Chymotrypsin, inaktive Komplexe zu bilden. Sie können aber auch Plasmin blockieren.

Von den pflanzlichen Antiplasminen sind die in Sojabohnen (21), Kichererbsen, Erdnüssen (22) und Kartoffeln gefundenen Proteasen zu erwähnen.

Therapeutisches Interesse haben die synthetischen Fibrinolyse-Inhibitoren erlangt. Dabei handelt es sich vor allem um die Epsilon-Aminocaproonsäure (EACA), die p-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA) und deren hydrierte Form, die 4-Aminomethylcyclohexancarbonsäure (AMCHA). Diese Substanzen stellen überwiegend Hemmstoffe der Plasminaktivierung dar (23).

PAMBA und AMCHA sind viel stärker wirksam als die EACA (24). PAMBA wurde z.B. therapeutisch mit Erfolg bei Hypermenorrhoe angewandt, als deren Ursache eine Hyperfibrinolyse nachgewiesen worden war (25).

4. Aktivatoren der Fibrinolyse

In zahlreichen menschlichen und tierischen Geweben wurden Aktivatoren entdeckt, die eine direkte Umwandlung des Plasminogens in Plasmin bewirken. Die quantitative Bestimmung dieser Gewebsaktivatoren gelang Astrup und Albrechtsen (26). Beim Menschen weisen Uterus (Myometrium), Nebennieren, Lymphdrüsen, Prostata und Schilddrüse den höchsten Aktivatorgehalt auf, während die Leber praktisch aktivatorfrei ist (27). Der Gewebsaktivator unterscheidet sich von dem im Blut entstehenden Aktivator durch größere Temperaturresistenz und Säurestabilität. Fearnley (10) vermutet, daß der Blutaktivator aus der Gefäßwand stammt, da die Endothelzellen venöser Gefäße Plasminogenaktivatoren enthalten, die in das Blut abgegeben werden.

Auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten sind Aktivatoren der Fibrinolyse nachweisbar, z.B. in der Frauenmilch (28), im Speichel (29), in der Tränenflüssigkeit (30) und im Urin (31).

Der aus dem Urin gewonnene Aktivator wird auch als U r o k i - n a s e bezeichnet. Diese wird wahrscheinlich von den Nierenepithelien produziert (32), wie Versuche mit in vitro kultivierten Nierenzellen zeigen. Der Wirkungsmechanismus der Urokinase beruht auf einer direkten Aktivierung des Plasminogens. Ihre physiologische Bedeutung scheint in der Freihaltung der ableitenden Harnwege von Fibringerinnseln zu liegen, die auf entzündlicher Basis oder bei Blutungen entstehen können (33). Die Kristallisation der Urokinase gelang Lesuk und Mitarbeitern im Jahre 1965 (34). Durch ihre fehlende Antigenität und Toxizität ist sie ein wertvolles Mittel bei der Behandlung thromboembolischer Erkrankungen. Hess und Goossens (35) konnten dies bei Rezidivverschlüssen in Extremitätenarterien demonstrieren,

nachdem die erneute Zufuhr von Streptokinase wegen der Gefahr einer anaphylaktischen Reaktion nicht mehr in Frage kam. Der breiten klinischen Anwendung der Urokinase stehen vorläufig die hohen Herstellungskosten im Wege.

Von den exogenen Aktivatoren seien nur die wichtigsten genannt. Über eine Steigerung der fibrinolytischen Aktivität nach intravenöser Injektion von Nikotinsäure berichteten erstmals Weiner und Mitarbeiter (36) im Jahre 1958. Diese Wirkung wurde von zahlreichen Autoren bestätigt (37,38,39,40). Es ergab sich, daß übliche orale und intramuskuläre Dosen keine vollständige Fibrinolyse bewirken. Ferner nimmt die fibrinolytische Aktivität schon 30 Minuten nach der intravenösen Applikation deutlich ab und kann auch durch Dauerinfusion nicht aufrechterhalten werden (38). Nach den Beobachtungen von Goossens (41) scheint der infolge peripherer Gefäßerweiterung auftretende "Flush" in direktem Zusammenhang mit der Fibrinolyse zu stehen, wobei als Ausdruck erhöhter lytischer Aktivität ein starker Flush auftritt und umgekehrt. Es wird angenommen, daß die Nikotinsäure über die Freisetzung eines Aktivators (40) in das fibrinolytische System eingreift.

Von den pyrogenen Substanzen ist Pyrexal, ein reines Lipopolysaccharid aus dem Endotoxin von *Salmonella abortus equi* (42), am besten untersucht. Bereits nach Dosen von 0,2 gamma Pyrexal i.v. wurde eine deutliche Steigerung der fibrinolytischen Aktivität thrombelastographisch nachgewiesen (43). Stamm (44) nimmt an, daß die Pyrogene keine ausreichende thrombolytische Wirkung besitzen, da nach 6-tägigen intravenösen Gaben von 0,2 gamma/die Pyrexal ebenso viele Rezidivembolien auftraten als ohne Behandlung (60-90%). Auch Sailer (40) konnte trotz thrombelastographisch nachweisbarer erhöhter fibrinolytischer Aktivität klinisch keine wesentliche Besserung erreichen. Die Wirkung der Pyrogene ist flüchtig und auch bei höherer Dosierung nicht sicher reproduzierbar (45), sodaß sie für eine thrombolytische Therapie nicht in Frage kommen. Zum Wirkungsmechanismus nehmen Deutsch und Mitarbeiter (46) an, daß die Pyrogene aus den Leukozyten einen stabilen Aktivator des fibrinolytischen Systems freisetzen.

Sie konnten durch Inkubation großer Mengen Pyrexal mit leukozytenhaltigem Plasma in vitro eine Lyseaktivierung hervorrufen, die mit leukozytenfreiem Serum nicht auftrat.

Die fibrinolytische bzw. thrombolytische Wirkung des H e p a r i n s und der H e p a r i n o i d e wird in der Literatur sehr unterschiedlich beurteilt. Marx und Mitarbeiter (47) konnten bei in vitro-Versuchen durch Zusatz von 0,5 gamma Heparin zu 0,5 ccm Plasma eine deutliche Steigerung der Fibrinolyse beobachten, während bei Erhöhung der Heparindosis auf 1,0 gamma schon eine Abschwächung bzw. Hemmung der Fibrinolyse eintrat. In vivo fand sich nach i.v. Injektionen von Heparin und Heparinoid häufig, jedoch nicht immer eine Zunahme der fibrinolytischen Aktivität. Witte und Mitarbeiter (48) sahen bei 10 Patienten nach intramuskulärer Injektion von 20 000 E Depot-Liquemin im Thrombelastogramm nie Anzeichen einer Fibrinolyse.- Einige Autoren wiesen auch auf eine thrombolytische Wirkung des Heparins hin (49,50). Sailer und Eber (51) stellten jedoch an experimentell gesetzten Gerinnungsthromben (bei Kaninchen) mit Heparin in 73,3% keine Verkleinerung der Gerinnsel fest, während bei kombinierter Heparin-Nikotinsäure-Behandlung in 68% deutliche Lysen nachweisbar waren. Auch Goossens (41) konnte bei seinen in vivo-Versuchen am Menschen mit dem Präparat Solvosal forte (12 ml = 2400 I.E. Heparin, 120 mg Nikotinsäure, 60 mg Rutin) diesen potenzierenden Effekt von Nikotinsäure und Heparin bestätigen. Rasche und Hiemeyer (52) erreichten unter Heparinzufuhr an 8 Stunden alten arteriellen Thromben nur bei 2 von 10 Tieren eine Rekanalisierung der verlegten Strombahn. Mit Heparinoid war eine Thrombolyse nicht möglich. Auch auf erhitzten Rinderfibrinplatten war keine fibrinolytische Aktivität meßbar, was eher gegen die von Halse (53) angenommene Direktaktivierung des Plasminogens durch Heparin und Heparinoid spricht.

Der wirksamste exogene Aktivator ist zur Zeit die Streptokinase (SK). Sie stellt ein Stoffwechselprodukt beta-hämolytischer Streptokokken dar und kommt normalerweise nicht im menschlichen Organismus vor. Bei fast allen Erwachsenen sind jedoch durch frühere Streptokokkeninfektionen Antikörper im Blut nachweisbar. Neben dem Antistreptolysin handelt es sich dabei vor allem um die Antistreptokinase, deren Titer großen individuellen Schwankungen unterliegt. Für eine fibrinolytische Behandlung ist die Höhe dieses Antikörpertiters entscheidend, da dementsprechend die Neutralisation der zugeführten SK erfolgt. Um Unterdosierungen zu vermeiden wird daher in der Klinik meistens der sog. Streptokinaseresistenztest durchgeführt, nach dessen Ergebnis sich die erforderliche Initialdosis berechnen läßt. Für die intravenöse Applikation stehen heute hochgereinigte Präparate zur Verfügung. Unverträglichkeitserscheinungen treten in letzter Zeit sehr selten auf.- Der genaue Wirkungsmechanismus der SK ist noch nicht bekannt. Entgegen der früheren Vermutung, daß die SK einen im Plasma vorhandenen inaktiven Proaktivator in den eigentlichen Aktivator überführt, der dann Plasminogen in Plasmin umwandelt (54), wird jetzt die Ansicht vertreten, daß ein bestimmter Molekülbezirk des Plasminogens die Proaktivator-Aktivator-Eigenschaft besitzt. Unter der Einwirkung von SK entsteht ein Proaktivator-Plasminogen-SK-Komplex, der als Aktivator wirkt. Dieser Aktivator kann andere noch nicht mit SK besetzte Proaktivator-Plasminogen-Moleküle in Plasmin umformen (55).

5. Indikationen zur thrombolytischen Therapie

Für die kausale Therapie der thromboembolischen Erkrankungen bieten sich zwei Behandlungsmethoden an:

Die operative Entfernung des Thrombus bzw. Embolus.

Ungünstige Lokalisation des Gefäßverschlusses sowie schlechter Allgemeinzustand des Patienten verbieten oft den chirurgischen Eingriff.

Die Thrombolyse durch Aktivierung des körpereigenen fibrinolytischen Systems mit Streptokinase und Urokinase.

Entscheidend für den therapeutischen Erfolg sind das Alter und der Aufbau der Gerinnsel (56). Während 1-3 Tage alte venöse Thromben durchschnittlich in 75% erfolgreich lysiert werden können, wird die Chance nach dieser Zeit infolge der fortschreitenden Organisation der Blutgerinnsel immer geringer (57). Nach 5 Tagen ist eine rasche Lyse kaum mehr zu erwarten (58,59). Bei funktionstüchtigem Kollateralkreislauf ist jedoch eine Rekanalisierung verlegter Gefäße nach längerer Zeit noch möglich, wie Sailer und Eber (60) in Tierversuchen zeigen konnten. Was die Struktur der Thromben betrifft, stellen Gerinnungsthromben, die hauptsächlich aus Fibrinbalken mit eingelagerten Erythrozyten bestehen, das geeignete Substrat für die Fibrinolyse dar. Primäre, fortgeschrittene Gefäßkrankheiten setzen die Erfolgsrate der lytischen Behandlung auf lange Sicht herab.

Nach den bisherigen Erfahrungen (hauptsächlich mit Streptokinase) ergeben sich folgende Indikationen für eine thrombolytische Therapie (57,61,62,63,64):

I. Arterielles System:

Akute Verschlüsse der Extremitätenarterien
Zentralarterienverschuß
Akuter Herzinfarkt
Lungenembolie

II. Venöses System:

Tiefe, ausgedehnte Phlebothrombosen der Extremitäten
Beckenvenenthrombose
Priapismus durch Thrombose
Zentralvenenthrombose

Um Rezidive zu vermeiden, muß sich der fibrinolytischen Therapie sofort die Behandlung mit Heparin und später mit Cumarinpräparaten anschließen.

Der Therapieerfolg ist bei den arteriellen Embolien eindeutig besser als bei den arteriellen Thrombosen. Als Erklärung dafür werden die kürzere Ausdehnung des embolischen Verschlusses, die geringeren sklerotischen Veränderungen des Hauptgefäßes und der meist gut ausgebildeten Kollateralgefäße und schließlich die geringere Haftfestigkeit an der Gefäßwand angegeben (57).

6. Meßmethoden

Bei der Behandlung akuter Thrombosen, Embolien und Infarkte mit fibrinolytisch wirkenden Präparaten und bei der Überwachung dieser Therapie gewinnen Nachweismethoden für Plasmin und für das gesamte fibrinolytische Potential (Plasminogen und Proaktivator) zunehmende Bedeutung. Aus der Vielzahl der Methoden ist zu erkennen wie schwierig es ist, quantitative Aussagen über die tatsächlich vorhandene fibrinolytische Aktivität einer Testflüssigkeit zu erhalten. Bisher haben die Plasmin-Bestimmungsmethoden die größte Bedeutung.

Es werden hier nur einige, in der Klinik häufig angewandte Methoden aufgeführt.

6.1 Fibrinplattenmethode nach Astrup und Müllertz (11)

Prinzip: Rinderfibrinplatten werden mit der zu untersuchenden Testlösung (Serum oder Plasma) beschickt. Die um den Testtropfen entstehende aufgehellte runde Zone (sog. Lysehof) ist ein Maß für die fibrinolytische Aktivität. Die Größe des Lysehofes ist durch zwei aufeinander senkrecht stehende Durchmesser, die mit dem Stechzirkel ausgemessen werden, definiert.

Die Methode stellt technisch sehr große Anforderungen und ermöglicht nur halb-quantitative Ergebnisse.

Durch Erhitzen der Fibrinplatten während 30-45 Minuten auf 80°C (65) wird das an Fibrin adsorbierte Plasminogen inaktiviert. Mit diesen Platten kann also die reine Plasminwirkung einer Testflüssigkeit bestimmt werden.

Bei der Erhitzung der Platten kommt es aber auch zu einer gewissen Denaturierung des Fibrins, so daß die Empfindlichkeit der Methode geringer ist (13). Die Lysehöfe sind nicht mehr so klar abgegrenzt.

6.2 Euglobulinlyse-Test (Modifikation nach von Kaulla (66))

Prinzip: Die Euglobuline werden durch Kohlendioxyd aus Citratplasma bei pH 5,2 - 5,3 ausgefällt, während die Albumin-Antiplasminne in Lösung bleiben. Durch Zentrifugieren erhält man die Euglobuline im Sediment, das dann in gepufferter Kochsalzlösung aufgelöst wird. Diese Euglobulinlösung wird mit Thrombin versetzt und zur Gerinnung gebracht. Gemessen wird die Zeit vom Gerinnungseintritt bis zur vollständigen Auflösung des Eigenfibringerinnsels. Man bestimmt vorwiegend die Wirkung des Plasmins ohne Hemmung durch die Albumin-Antiplasminne.

Die Euglobulinfibrinolyse weicht oft erheblich von der Spontanfibrinolyse ab, da nur ein Teil der Inhibitoren ausgeschaltet ist (die Globulinhemmstoffe sind vorhanden). Häufig sind Veränderungen in der Euglobulinfibrinolyse Ausdruck von Schwankungen der Antiplasminaktivität bei gleichbleibendem Plasmin. Die klinische Interpretation muß daher mit Vorsicht erfolgen (13).

6.3 Thrombelastographie nach Hartert (67)

Prinzip: Mit dem Thrombelastographen kann die während des Gerinnungsvorganges erfolgende Veränderung der Festigkeit des Thrombus in Form einer typischen Kurve registriert werden.

Eine mit Blut gefüllte Stahlküvette wird durch einen Synchronmotor regelmäßig hin- und herbewegt. Ein von oben torsionselastisch aufgehängter zylindrischer Stift ragt in die Küvette. Die Zähigkeit der Blutmasse wird durch das ausfallende Fibrin so groß, daß der Torsionswiderstand des Drahtes überwunden wird und der eintauchende Stift bei jeder Drehung mitgenommen wird.

Die Ausschläge des Zylinders werden mit Spiegel und Lichtquelle auf einem Photopapier registriert. Die vom Thrombelastogrammen geschriebene Kurve ist der Ausdruck der Konsistenz des Fibringerinnsels. Bei Verfestigung der Fibrinfasern weichen die Kurven auseinander. Bei beginnender Auflösung des Fibrins nähern sie sich wieder und verlaufen bei vollkommener Lyse als einzige Linie.

Die Anschaffung des Gerätes ist sehr kostspielig. Häufig wird das Gerinnsel im Apparat akzidentell verändert (z.B. Abrißphänomen etc.), so daß die Fibrinolyse nicht mehr weiter verfolgt werden kann.

Die genannten Methoden können bestenfalls als halb-quantitative bezeichnet werden. Die von verschiedenen Untersuchern bzw. Laboratorien ermittelten Standardwerte weichen oft erheblich voneinander ab und müssen deshalb mit äußerster Vorsicht beurteilt werden. Um diese Schwierigkeiten zu beseitigen wurde von Goossens und Mitarbeitern (68) eine quantitative Bestimmungsmethode, die Papierfibrinolyse, entwickelt. Später verzichtete man auf die Aktivierung des Testsystems mit Streptokinase und nannte die Methode Spontanpapierfibrinolyse (69).

Unsere Aufgabe bestand darin, die Methode der Spontanpapierfibrinolyse zu standardisieren.

Experimenteller Teil

1. Verwendete Materialien und Geräte

- (1) Natriumcitrat 3,8%ig, neutral
- (2) Chromatographiepapier (Macherey & Nagel, Düren) 260
- (3) Fibrinpapier (Macherey & Nagel, Düren) 260 N
- (4) Aqua bidestillata (Ampuwa)
- (5) Streptase (Behring), 5000 E/Amp.
- (6) Veronal-HCl-Puffer (0,05 mol.), pH 7,3
- (7) Amidoschwarzlösung
- (8) Elphorentfärber (100 ml Eisessig + 900 ml Methanol)
- (9) Elphor-Transparenzöl (Paraffinum liquidum + alpha-Brom-Naphthalin zu gleichen Gewichtsteilen)
- (10) n/10 Natronlauge
- (11) Millimeterpapier
- (12) Filterpapier
- (13) Auswertegerät "Elphor-Integrant" (Bender & Hobein) oder
- (14) Photometer "Eppendorf" (Netheler & Hinz) mit Monochromat-filter (Hg 546 nm)
- (15) Brutschrank (37°C)
- (16) Objektträgerpinzetten
- (17) Glasschalen "Assistent" mit Messingdeckel, Größe 1 (mit Dichtung)
- (18) Glasplatten (20 x 4 cm)
- (19) Reagenzgläser (Länge 9,5 cm, Durchmesser 1,5 cm)
- (20) Normalküvetten (Type B, lichte Breite 10 mm) zum "Eppendorf"-Photometer
- (21) Papierschneidemaschine

2. Methode

Zur quantitativen Bestimmung der Fibrinolyse wurde von Goossens und Mitarbeitern (68) die aktivierte Papierfibrinolyse entwickelt, die später zur Spontanpapierfibrinolyse (69,70) umgewandelt wurde. Bei dieser Methode wird auf die Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase verzichtet.

Prinzip:

Chromatographiepapier wird mit in der Menge und Konzentration definierter Rinderfibrinogenlösung getränkt, die mittels Thrombinlösung in Fibrin umgewandelt wird. Genaue Angaben über die Arbeitsvorgänge bei der Fibrinpapierherstellung im Labor sind in den Dissertationen von Zantl (70) und Sinos (71) nachzulesen. Es steht dann ein sog. Standardfibrinpapier (SFP) als Substrat zur Verfügung, das eine dünne Fibrinschicht mit relativ großer Oberfläche aufweist. Definierte Teile des SFP werden in der auf fibrinolytische Aktivität zu prüfenden Testlösung (z.B. Citratplasma) inkubiert. Danach erfolgt die Weiterbehandlung etwa analog dem Vorgang bei der Elektrophorese, d.h. nach Färbung mit Amidoschwarz und Entfärbung mit Methanol-Eisessig kann der Restfibrin-gehalt des SFP quantitativ photometrisch bestimmt werden.

SFP wird von der Firma Macherey & Nagel hergestellt. Wir sind von der Selbsterstellung abgekommen, weil bei der Herstellung kleiner Mengen leicht Chargendifferenzen auftreten. Das Ziel bei der Entwicklung der Methode war neben quantitativer Messung ein Substrat gleichbleibender Qualität und Lagerungsfähigkeit zu finden. Nur ein standardisiertes Fibrinpapier ermöglicht den Vergleich zwischen in größeren Zeitabständen kontrollierten Patienten und/oder verschiedenen Laboratorien bzw. Untersuchern.

3. Versuchsdurchführung

Wir prüften das SFP zunächst nach der von Sinos (71) modifizierten Methode der Spontanpapierfibrinolyse.

Testansatz: 1 ml Citratplasma (1:5)
6,5 ml Veronal-HCl-Puffer (pH 7,3)

Aus einem Fibrinpapierstreifen (3,9 x 15 cm) werden 5 Folien geschnitten. Diese Testfolien (3,9 x 3 cm) werden in einem flachen Glasschälchen mit dem verdünnten Citratplasma (siehe Testansatz) getränkt und nach Abstreifen der überstehenden Flüssigkeit in Diarähmchen (ohne Glas) eingespannt. Die Folien werden anschließend in einer feuchten Kammer aufbewahrt und 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach Färbung und Entfärbung der Folien traten jedoch intensiver angefärbte Randzonen von unterschiedlichem Ausmaß auf, die auch von Sinos (71) beschrieben wurden. Bei der photometrischen Auswertung konnten wir keine einheitlichen Extinktionswerte erzielen. Wir führten diese Randeffekte auf Ansammlung des Plasmas an der Berührungsstelle der Folien mit den Rähmchen zurück und veränderten deshalb die Methode.

Die SFP-Streifen wurden wie vorher mit dem Plasma-Puffergemisch getränkt und dann vorsichtig auf Glasplatten gelegt (mit Pinzette), so daß keine Luftblasen auftraten. Weiterbehandlung wie bei der Methode Sinos. Eine gleichmäßige Verteilung des Plasmas über den ganzen Streifen ohne Randeffekte war dadurch auch nicht gewährleistet (siehe Tab. 4).

Wir versuchten nun das überschüssige Plasma durch einmaliges Überrollen mit einer Gummiwalze abzustreifen. Die Meßergebnisse waren zwar besser (Tab. 5), jedoch noch nicht eindeutig reproduzierbar.

Die besten Versuchsbedingungen erreichten wir durch Inkubation der SFP-Streifen im Plasma. Diese Methode soll hier näher beschrieben werden.

3.1 Testansatz und Inkubation

Citratblut (1 Teil 3,8%ige Na-Citrat-Lösung und 4 Teile Blut) wird 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Plasma wird abgehebert.

Ansatz: 1 ml Citratplasma
6,5 ml Veronal-HCl-Puffer (pH 7,3)

Als Gefäß verwendet man Glasschalen mit gut abschließendem Deckel (siehe Materialverzeichnis). Das Plasma wird mit dem Puffer gleichmäßig vermischt. Den halbierten SFP-Streifen (7,5 x 3,9 cm) legt man mit der Pinzette auf die Plasmaverdünnung und verschließt die Glasschale mit dem Deckel. Der Streifen saugt sich voll und taucht unter. Das Fibrinpapier wird 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die andere Hälfte des SFP-Streifens kann für eine Doppelbestimmung verwendet werden.

3.2 Wässerung und Trocknung

Wässerung:

Um überschüssiges Plasma zu entfernen wird der Streifen nach der Inkubation 15 Minuten in fließendem Leitungswasser gespült. Wir haben auf die 20-stündige Wässerung in isotonischer Kochsalzlösung verzichtet, weil dabei wahrscheinlich eine Lyseaktivierung auftritt, wie aus den Versuchen von Sipos (71) hervorgeht. Wir wollten ohne aktivierende Zusätze arbeiten und außerdem den Zeitaufwand der Methode herabsetzen.

Trocknung:

Das Fibrinpapier wird zum Trocknen mit der Pinzette aus der Glasschale genommen, auf Filterpapier gelegt und mehrmals gewendet.

3.3 Färbung, Entfärbung und Trocknung

Die trockenen Teststreifen und der Leerwert (Elphorpapier ohne Fibrin) werden einzeln in Amidoschwarzlösung getaucht

und unter ständigem Schwenken des Farbbehälters 10 Minuten (früher 15 Minuten) gefärbt.

Unmittelbar nach Abgießen der Farbe erfolgt die Entfärbung mit Methanol-Eisessig (9:1) in mehreren Stufen bis der Entfärber klar bleibt. Dieser Vorgang dauert je nach Anzahl und Farbtintensität der Streifen 45-60 Minuten. Die entfärbten Streifen werden auf Filterpapier gelegt und getrocknet.

3.4 Photometrische Auswertung

Es stehen folgende Methoden zur Verfügung:

Die Transparenzmethode, bei der die Streifen in Transparenzöl gelegt und anschließend im "Elphor-Integraph" oder im "Eppendorf-Photometer" ausgewertet werden.

Die Eluationsmethode, bei der die durch Methanol-Eisessig entfärbten Folien eluiert werden. Die Extinktion der Farblösung wird im "Eppendorf-Photometer" gemessen.

Für alle Messungen wird ein Monochromat-Filter (Hg 546 nm) verwendet.

3.4.1 Transparenzmethode

Der transparente Teststreifen und der Leerwert (siehe 3.3) werden zwischen zwei Glasplatten gelegt. Der Leerwert dient zur Eichung des Photometers. Beim "Elphor-Integraph" werden die Extinktionswerte des Teststreifens im Abstand von 1 mm auf Millimeterpapier gestanzt und mit einem Zählwerk angezeigt. Von dem 7,5 cm langen Streifen werden nur 5 cm ausgewertet, da der Rand (am Anfang und Ende des Streifens) durch das Anfassen mit der Pinzette oft beschädigt ist und außerdem zur Markierung dient.

Für die Auswertung der transparenten Streifen im "Eppendorf-Photometer" benötigt man einen Panierelektrophoreseauswertungszusatz. Die Extinktionswerte, bezogen auf den Leerwert, werden an einer Skala abgelesen und graphisch aufgetragen.

3.4.2 Eluationsmethode

Der Teststreifen wird in 5 Folien (1 x 3 cm) zerschnitten, wobei auch hier die Randzonen verworfen werden. In Reagenzgläser pipettiert man jeweils 5 ml n/10 Natronlauge und gibt mit der Pinzette die Testfolie dazu. In einem Reagenzglas befindet sich die Leerwertfolie. Unter ständigem Schütteln der Gläser werden die Folien durch die Natronlauge entfärbt. Nach 30 Minuten kann die Extinktion der Farblösung (nach Entfernung der Folien) in Normalküvetten im "Eppendorf-Photometer" gemessen werden.

3.4.3 Berechnung der Lysequote

Die Lysequote ist ein Maß für die fibrinolytische Aktivität der Testflüssigkeit. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\text{Lysequote in \%} = 100 - \frac{(\text{Lysewert} - \text{Leerwert})}{(\text{Fibrinwert} - \text{Leerwert})} \times 100$$

Leerwert: 100% Lyse-Bezugswert, der nur zur Eichung des Photometers dient und daher meßtechnisch nicht erfaßt werden muß. Verwendet wird ein gefärbtes und entfärbtes Chromatographiepapier ohne Fibrinbelag. Der Leerwert kann unter Lichtabschluß etwa 4 Wochen aufbewahrt werden.

Fibrinwert: 0%-Lysewert. Zu seiner Bestimmung wird Standard-Fibrinpanier (SFP), d.h. gefärbtes und entfärbtes Chromatographiepapier mit Fibrinbelag photometrisch ausgewertet.

Lysewert: Extinktionswert von gefärbtem und entfärbtem SFP, das vorher mit der Testflüssigkeit, z.B. Plasma, getränkt und inkubiert wurde.

Der Fibrinwert sollte den 0%-Lysewert darstellen. Wie jedoch aus früheren Versuchen (71,72) und auch aus unserer Arbeit hervorgeht, liegen die Extinktionswerte (EW) des SFP (siehe Tab. 2) bedeutend niedriger als die EW des im Plasma inkubierten SFP (Tab. 5). Als Erklärung hierfür ist die stärkere Anfärbung der an das SFP adsorbierten Plasmaproteine zu nennen. Demnach würde sich aus o.g. Formel eine negative Lysequote ergeben, was zu der falschen Annahme führt, daß das SFP bereits eine Lyse aufweist. Aus diesem Grund wurde die Lysequote (LQ) relativ zu dem mit Plasma getränkten Papier bestimmt.

Wir haben uns auf folgende Berechnung festgelegt:

Bei Bestimmung der LQ verschiedener Plasmen (ohne zusätzliche Aktivierung) gilt als 0%-Lysewert der höchste ermittelte EW.

Bei Berechnung der LQ nach Aktivierung desselben Plasmas, z.B. mit Streptokinase, dient der EW vor der Aktivierung als 0%-Lysewert.

Die Lysequote wird also immer in Relativ-Prozent angegeben. In der Formel wird der Fibrinwert jeweils durch einen der genannten 0%-Lysewerte ersetzt.

3.5 Fehlerquellen

Das Fibrinpapier muß trocken und luftdicht verpackt (nicht über 20°C, unter Lichtabschluß) aufbewahrt werden.

Eine ungleichmäßige Verteilung der Fibrinschicht über den Streifen führt zu erheblicher Abweichung der Extinktionswerte, ebenso Beschädigung der Schicht durch Pinzetten, Knicke und Fingerabdrücke.

Ausgeflockter Veronalpuffer ist für den Testansatz unbrauchbar, da sich der pH-Wert ändert.

Luftblasen, die bei der Inkubation des Streifens auftreten können, müssen entfernt werden, da sie eine gleichmäßige Benetzung mit Plasma verhindern.

Beim Wässern dürfen die Streifen nicht direkt vom Wasserstrahl getroffen werden, da sie sehr leicht zerknittert werden.

Während des Färbens und Entfärbens muß der Behälter leicht bewegt werden, damit die Streifen nicht zusammenkleben. Berühren der Streifen, z.B. mit Pinzetten, ist vor Beendigung des Entfärbevorgangs unbedingt zu vermeiden.

Beim Einlegen der transparenten Streifen zwischen die Glasplatten dürfen keine Luftblasen auftreten. Öltropfen an der Außenseite der Platten sind sorgfältig abzuwischen.

Der "Elphor-Integrph" muß 30 Minuten vor Beginn der Messung eingeschaltet werden (sonst falsche Ergebnisse!).

Die Verwendung einer Papierschneidemaschine zur genauen Abtrennung der 1 cm breiten Folien ist erforderlich.

Die bei der Fluationsmethode benötigten Küvetten müssen unbedingt sauber sein.

4. Versuche zur Spontanpapierfibrinolyse

Die von Sipos (71) vorgeschlagene Methode war nicht eindeutig reproduzierbar und mußte deshalb modifiziert und weiterentwickelt werden. Bei unserer Glasplattenmethode und Methode der Inkubation des SFP im Plasma benutzten wir als Meßgerät erstmals das "Eppendorf-Photometer". Um zunächst zu prüfen ob das SFP eine gleichmäßige Fibrinschicht aufweist, wurden die nachfolgenden Bestimmungen durchgeführt. Die gemessenen Extinktionswerte sind in Tabellen aufgeführt, statistisch ausgewertet und graphisch aufgetragen.

Systematische und zufällige Fehler, die bei der Herstellung, Behandlung und Auswertung der Fibrinpapierstreifen auftreten können, werden statistisch ermittelt.

Aus einer (M) Anzahl von Streifen werden je (N) Werte ausgemessen. Die Einzelwerte sind mit dem Index (j), die einzelnen Streifen mit dem Index (i) bezeichnet.

Die Variationsbreite pro Streifen R_i ergibt sich aus:

$$R_i = x_{j \max} - x_{j \min}$$

Durchschnittswert $\bar{R}$ der Variationsbreiten R_i :

$$\bar{R} = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M R_i$$

Die Standardabweichung s wird aus folgender Gleichung berechnet:

$$s = \frac{\bar{R}}{d}$$

wobei d ein Tabellenwert ist, der aus der Gauß'schen Normalverteilung resultiert und für 5 Meßwerte pro Streifen 2,326 beträgt.

Innerhalb der Streubreite $R = \pm 3 s$, bezogen auf die Mittellinie der Gauß'schen Verteilungskurve, liegen 99,73% aller Meßwerte. Die Toleranzgrenze T ist ein Maß für die zu erwartende Streuung der Meßpunkte.

$$T = \bar{x}_{\max} - \bar{x}_{\min} + 6 s$$

Nur 0,27% aller Werte liegen außerhalb dieser Grenze (72).

4.1 Auswertung des SFP und Gegenüberstellung der Meßmethoden.

Acht SFP-Streifen wurden, wie in Punkt 3.3 beschrieben, mit Amidoschwarz gefärbt und mit Methanol-Eisessig entfärbt. Wir haben jeweils eine Hälfte des Streifens in 1 cm breite Folien zerschnitten und mit der Eluationsmethode ausgemessen, während die Extinktionswerte der übrigen Streifen mit der Transparenzmethode ermittelt wurden. Die bisher benutzte Auswertung im Integrator sei an einem Beispiel zum Vergleich angegeben.

Tabelle 1: Transparenzmethode -- "Integraph"

Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_i$	R_i
a	0,257	0,252	0,259	0,249	0,251	0,254	0,010
b	0,259	0,259	0,257	0,252	0,253	0,256	0,007
c	0,244	0,247	0,256	0,254	0,251	0,250	0,012
d	0,252	0,264	0,262	0,261	0,257	0,259	0,012
e	0,247	0,247	0,248	0,256	0,255	0,251	0,009
f	0,252	0,241	0,241	0,244	0,257	0,248	0,016
g	0,252	0,254	0,254	0,247	0,246	0,251	0,008
h	0,246	0,247	0,251	0,248	0,246	0,248	0,005

A = 0,252 (arithmetischer Mittelwert)

s = 0,0043 (Standardabweichung)

T = 0,037 (Toleranzgrenze)

Tabelle 2: Transparenzmethode -- "Eppendorf-Photometer"

Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_i$	R_i
a	0,230	0,240	0,232	0,235	0,235	0,234	0,010
b	0,236	0,233	0,233	0,235	0,228	0,233	0,008
c	0,220	0,225	0,215	0,230	0,220	0,222	0,015
d	0,230	0,235	0,235	0,230	0,240	0,234	0,010
e	0,217	0,222	0,227	0,227	0,232	0,225	0,015
f	0,225	0,226	0,225	0,230	0,235	0,227	0,015
g	0,220	0,222	0,227	0,227	0,229	0,225	0,009
h	0,222	0,237	0,220	0,222	0,220	0,225	0,015

$$A = 0,228$$

$$s = 0,0052$$

$$T = 0,043$$

Tabelle 3: Eluationsmethode - "Eppendorf-Photometer"

Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_i$	R_i
a	0,172	0,172	0,164	0,167	0,172	0,169	0,008
b	0,172	0,163	0,172	0,172	0,167	0,169	0,009
c	0,165	0,172	0,168	0,170	0,167	0,168	0,007
d	0,170	0,175	0,170	0,170	0,175	0,172	0,005
e	0,159	0,165	0,167	0,165	0,164	0,164	0,008
f	0,171	0,164	0,170	0,162	0,164	0,166	0,009
g	0,162	0,165	0,173	0,170	0,165	0,167	0,011
h	0,165	0,159	0,160	0,166	0,165	0,164	0,008

$$A = 0,167$$

$$s = 0,0035$$

$$T = 0,029$$

Die Abbildung 1 zeigt die Extinktionswerte (Ordinate) der einzelnen SFP-Streifen (Abszisse), ermittelt im "Eppendorf-Photometer", wobei für jeden Streifen 10 Meßwerte vorliegen. Davon wurden 5 nach der Transparenzmethode und 5 nach der Eluationsmethode ausgemessen. Die im Integrator registrierten Einzelwerte liegen etwa im Bereich der im Eppendorf-Photometer angezeigten Werte. Sie sind der besseren Übersicht wegen in Abb. 1 nicht dargestellt. Aus dem Diagramm ist deutlich erkennbar, daß bei der Transparenzmethode eine größere Streuung der Extink-

Standard – Fibrinpapier

Eppendorf – Photometer

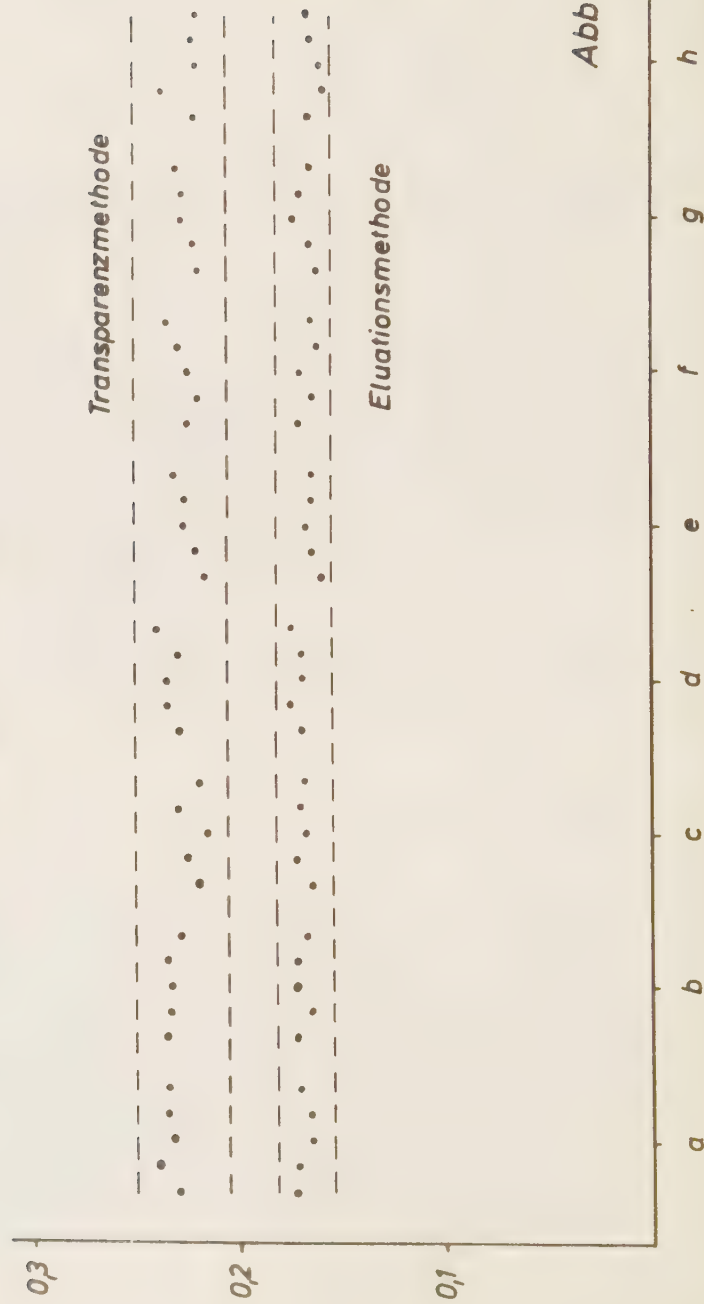


Abb: 1

Standard – Fibrinpapier

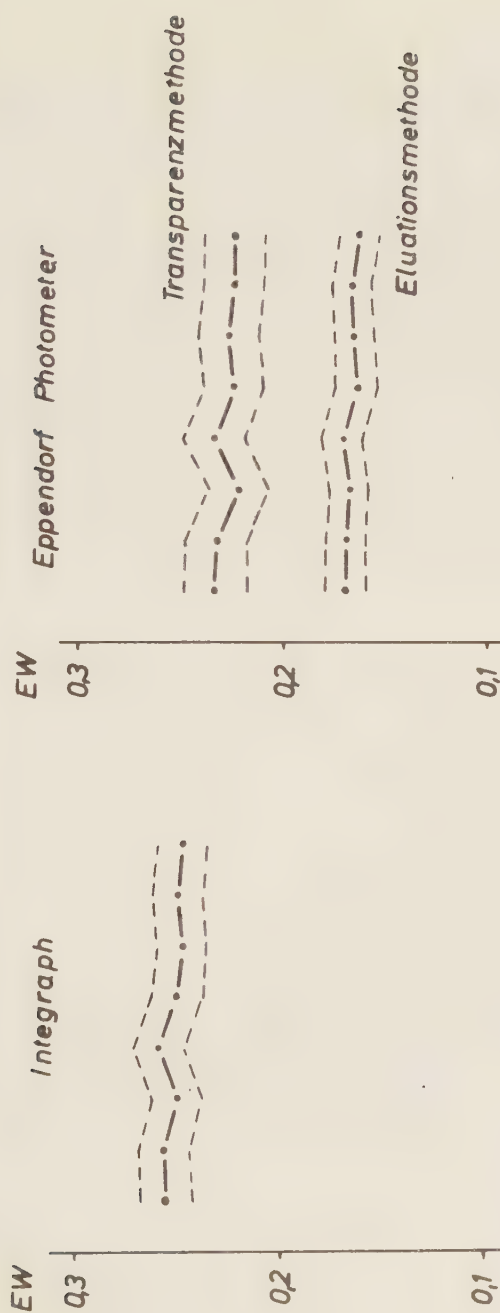


Abb:2

Abb:3

tionswerte (EW) auftritt als bei der Eluationsmethode. Die Meßpunkte liegen bei der zuletzt genannten Methode auf einem niedrigeren Niveau, da der EW von der Menge der Natronlauge abhängig ist.

Die arithmetischen Mittelwerte und die statistisch errechneten Streubreiten sind in Abb. 2 für die Integrgraph-Auswertung und in Abb. 3 für die Eppendorf-Photometer-Auswertung dargestellt. Innerhalb des gestrichelt gezeichneten Bandes liegen 99,73% aller Meßwerte. Die Breite des Bandes ist ein Maß für die zufälligen Fehler. Aus dem Kurvenverlauf können die systematischen Fehler, wie z.B. ungleichmäßige Fibrinschicht, beurteilt werden. Da die Tendenz aller Kurven ähnlich ist, kann man schließen, daß die bei der Herstellung und Auswertung des SFP auftretenden Fehler mit den genannten Meßmethoden erfaßt werden. Die geringste Streubreite und den gleichmäßigsten Verlauf zeigen die eluierten Streifen.

4.2 Inkubation der mit Plasma getränkten SFP-Streifen auf Glasplatten, sog. Glasplattenmethode

Mit diesem Versuch wollten wir eine Verbesserung der von Sipos (71) modifizierten Methode erreichen. Wir behielten den Testansatz bei.

Ansatz: 1 ml Mischplasma

6,5 ml Veronal-HCl-Puffer (pH 7,3)

6 SFP-Streifen wurden halbiert, mit demselben Mischplasma getränkt und auf Glasplatten gelegt. Bei jeweils einer Hälfte der Streifen entfernten wir das überschüssige Plasma mit einer Gummirolle. Die andere Hälfte streiften wir nach der Benetzung mit Plasma lediglich am Rand der Glasschale ab.

Die Auswertung erfolgte nach der Transparenzmethode im Eppendorf-Photometer.

Tabelle 4: Nicht ausgerollte Streifen

Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_1$	R_i
a	0,545	0,475	0,495	0,490	0,510	0,503	0,070
b	0,480	0,500	0,440	0,450	0,455	0,465	0,060
c	0,490	0,490	0,515	0,510	0,520	0,505	0,030
d	0,520	0,510	0,520	0,510	0,560	0,524	0,040
e	0,460	0,435	0,465	0,420	0,475	0,451	0,055
f	0,480	0,485	0,460	0,440	0,470	0,467	0,045

$$A = 0,486$$

$$s = 0,0214$$

$$T = 0,203$$

Tabelle 5: Ausgerollte Streifen

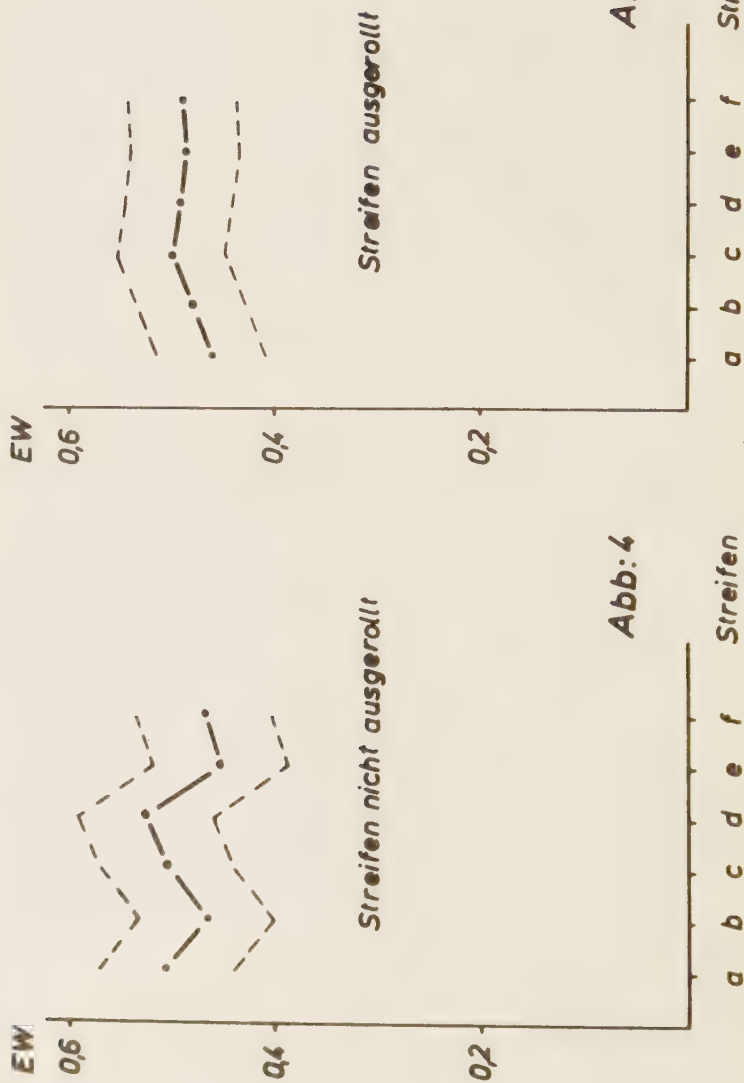
Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_1$	R_i
a	0,480	0,460	0,455	0,430	0,470	0,459	0,050
b	0,465	0,475	0,435	0,470	0,485	0,478	0,030
c	0,490	0,435	0,520	0,520	0,480	0,499	0,040
d	0,480	0,485	0,510	0,500	0,480	0,491	0,030
e	0,480	0,475	0,435	0,470	0,510	0,486	0,040
f	0,480	0,500	0,500	0,450	0,510	0,488	0,060

$$A = 0,484$$

$$s = 0,0179$$

$$T = 0,148$$

Plasma ohne Zusätze – Glasplattenmethode



Die "Glasplattenmethode" ist nicht eindeutig reproduzierbar, wie aus dem unregelmäßigen Kurvenverlauf und der großen Streubreite in Abb. 4 und 5 ersichtlich ist. Der Grund hierfür liegt vor allem in der unterschiedlichen Verteilung des Plasmas auf den SFP-Streifen.

Durch das Ausrollen des mit Plasma getränkten SFP wurden die Meßergebnisse besser. Die Standardabweichung s verringerte sich von $s = 0,0214$ (nicht ausgerollte Streifen) auf $s = 0,0179$.

Die Standardisierung und allgemeine Anwendung dieser Methode im Labor schien uns trotzdem nicht zweckmäßig, da die Toleranzgrenzwerte T zu groß waren. Wegen der schlechten Ergebnisse wurde auf die Fluierung der Streifen verzichtet.

4.3 Inkubation der SFP-Streifen im Plasma

Wir behielten die Zusammensetzung des Testansatzes bei (siehe unter 4.2).

Der Vorteil dieser unter 3.1 beschriebenen Methode besteht darin, daß der SFP-Streifen während der Inkubationszeit im Plasma schwebt und sich deshalb gleichmäßig vollsaugen kann. Auf diese Weise wurden 6 SFP-Streifen mit Plasma getränkt und wie üblich weiterbehandelt. Auswertung im "Eppendorf-Photometer".

Tabelle 6: Transparenzmethode - "Eppendorf-Photometer"

Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_1$	R_1
a	0,470	0,475	0,480	0,480	0,490	0,479	0,020
b	0,480	0,495	0,495	0,500	0,510	0,496	0,030
c	0,505	0,515	0,495	0,490	0,485	0,498	0,030
d	0,495	0,490	0,480	0,500	0,485	0,490	0,020
e	0,500	0,495	0,485	0,495	0,495	0,494	0,015
f	0,490	0,470	0,495	0,505	0,500	0,492	0,035

$$A = 0,492$$

$$s = 0,0107$$

$$T = 0,083$$

Tabelle 7: Eluationsmethode - "Eppendorf-Photometer"

Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_i$	R_i
a	0,360	0,365	0,370	0,380	0,370	0,369	0,020
b	0,365	0,370	0,375	0,380	0,380	0,374	0,015
c	0,370	0,375	0,380	0,370	0,380	0,375	0,010
d	0,385	0,385	0,380	0,370	0,370	0,378	0,015
e	0,385	0,380	0,385	0,365	0,385	0,380	0,020
f	0,370	0,370	0,380	0,375	0,375	0,374	0,010

$$A = 0,375$$

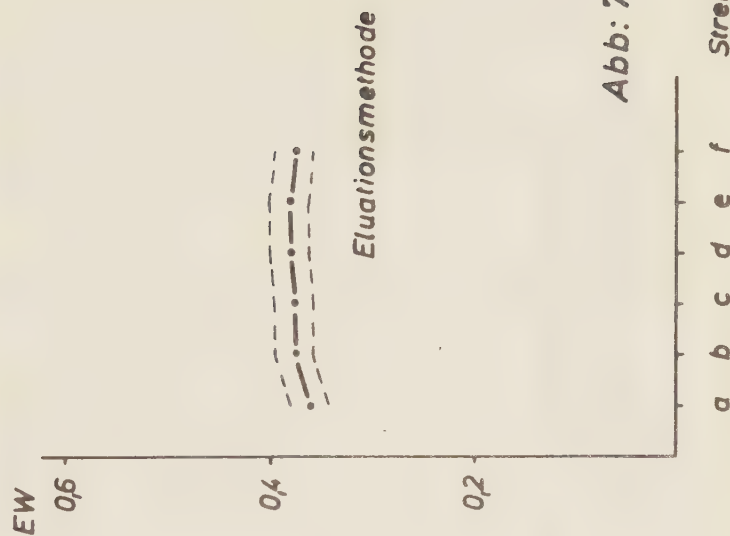
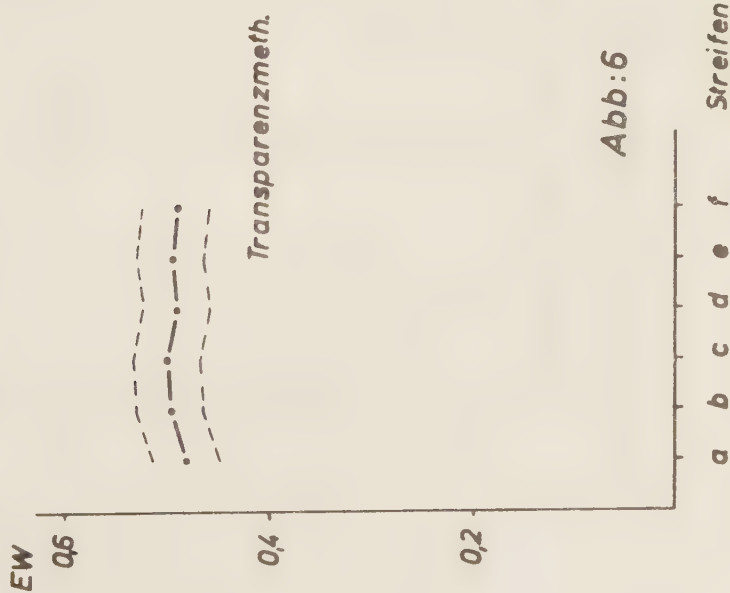
$$s = 0,0065$$

$$T = 0,047$$

Im Vergleich zu der unter 4.2 beschriebenen "Glasplattenmethode" sind die statistisch ermittelten Werte s und T bei der hier gewählten Methode der Inkubation der SFP-Streifen im Plasma wesentlich niedriger, d.h. die Meßfehler sind kleiner geworden. Dies macht sich besonders bei der Eluationsmethode bemerkbar. Wir führen den kleineren Fehler bei dieser Modifikation der Spontanpapierfibrinolyse hauptsächlich auf die gleichmäßigere Benetzung des SFP mit Plasma zurück.

Der nahezu ideale parallele Kurvenverlauf der in Abb. 6 und 7 eingetragenen Mittelwerte hebt die guten Ergebnisse nochmals deutlich hervor. Die Überlegenheit der Eluationsmethode zeigt sich in der geringeren Streubreite in Abb. 7.

Inkubation des SFP im Plasma (ohne Zusätze)



Vergleich der Extinktionswerte zwischen der Transparenz- und der Elutionsmethode



Das Verhältnis der EW zwischen beiden Meßmethoden ist in Abb. 8 dargestellt. In diesem Diagramm sind die Mittelwerte der Messungen berücksichtigt, bei denen Eluations- und Transparenzmethode verwendet wurden. Auf der Abszisse sind die Transparenz-EW (T-EW) und auf der Ordinate die Eluations-EW (E-EW) aufgetragen; z.B. entspricht einem T-EW von 0,4 einem E-EW von 0,3. Wie schon erwähnt hängen die EW der Eluationsmethode von der Menge der n/10 NaOH ab. Die Relation ist annähernd linear und reproduzierbar.

4.4 Bestimmung der Lysequote von Plasmen gesunder Versuchspersonen und Marcumar-Patienten.

Wir bestimmten die spontane fibrinolytische Aktivität der Plasmen von 6 gesunden Versuchspersonen und stellten dieser Gruppe 6 Patienten gegenüber, die wegen obliterierender Angiopathien mit Marcumar behandelt wurden. Der Quickwert lag bei den gesunden Versuchspersonen (VP) zwischen 90 und 100%, bei den Marcumar-Patienten um 25%.

Die Auswertung der im Plasma inkubierten SFP-Streifen erfolgte bei dieser Versuchsreihe nur nach der Transparenzmethode im "Eppendorf-Photometer".

In den beiden folgenden Tabellen sind die gesunden VP mit P_1 bis P_6 und die Marcumar-Patienten mit M_1 bis M_6 bezeichnet.

Tabelle 8: Gesunde Versuchspersonen

Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_1$	Lyse (Rel.%)
P_1	0,510	0,495	0,500	0,490	0,500	0,499	19,0
P_2	0,555	0,575	0,560	0,560	0,555	0,561	8,7
P_3	0,520	0,540	0,540	0,540	0,530	0,534	13,0
P_4	0,490	0,475	0,480	0,490	0,495	0,486	21,2
P_5	0,610	0,610	0,605	0,605	0,610	0,608	1,0
P_6	0,615	0,615	0,620	0,615	0,615	0,616	0

Tabelle 9: Marcumar-Patienten

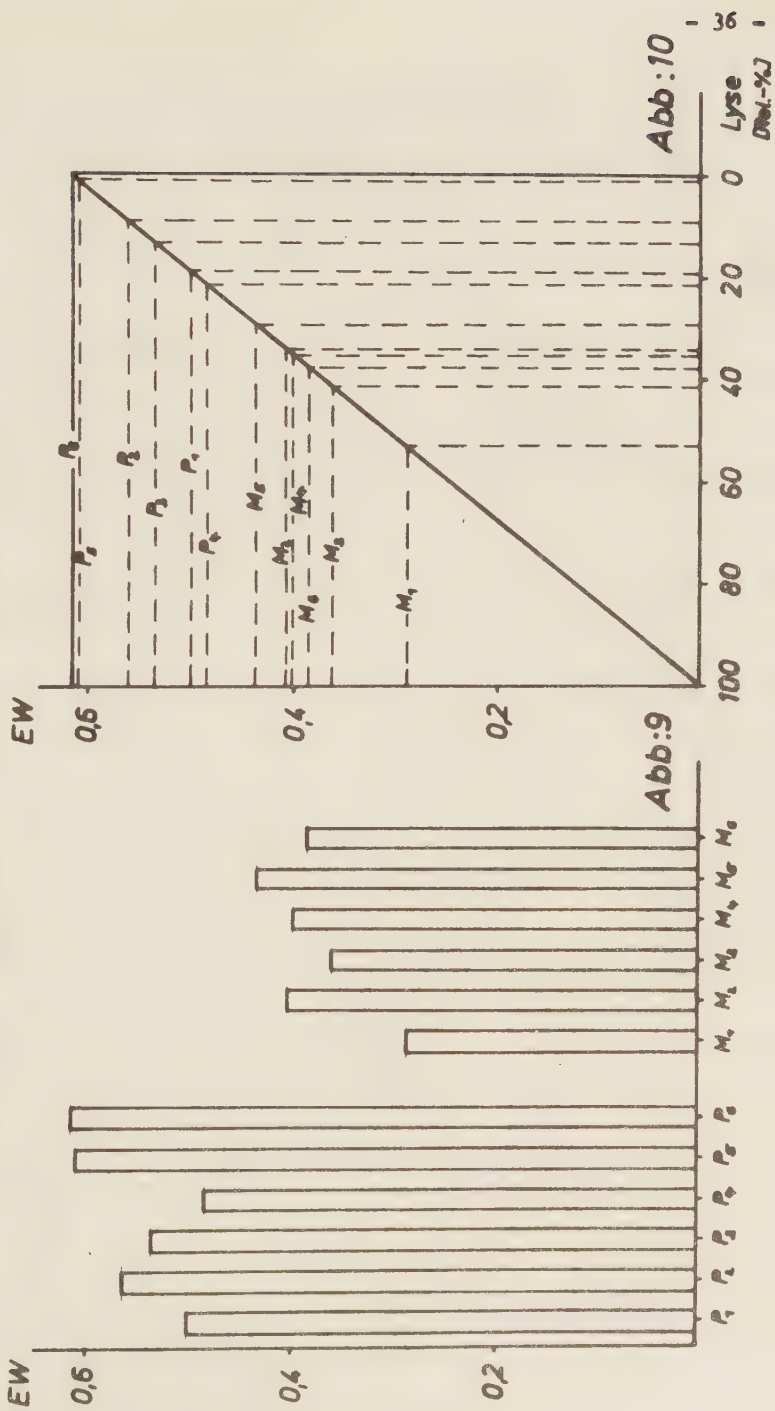
Str.	Extinktionswerte					$\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)
M ₁	0,300	0,290	0,280	0,285	0,280	0,287	53,3
M ₂	0,410	0,420	0,400	0,400	0,400	0,406	34,0
M ₃	0,360	0,350	0,355	0,365	0,360	0,358	41,8
M ₄	0,405	0,405	0,400	0,402	0,400	0,402	34,6
M ₅	0,435	0,440	0,430	0,435	0,440	0,436	29,2
M ₆	0,390	0,390	0,380	0,385	0,380	0,385	37,5

Zur Berechnung der Lysequote diente der höchste Mittelwert von 0,616 als 0%-Lysewert. Für die gesunden VP liegen die Lysequoten zwischen 1,0 und 21,2 Rel.%, für die der Marcumar-Patienten zwischen 29,2 und 53,3 Rel.%. Demnach scheint bei der Marcumar-Therapie eine Zunahme der fibrinolytischen Aktivität aufzutreten. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse ist die geringe Zahl der untersuchten Patienten zu berücksichtigen. Ferner sind Nebenwirkungen anderer Präparate, die evt. eine Steigerung der Fibrinolyse bewirken könnten, nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Statistische Berechnungen nach der Varianzanalyse ergaben jedoch, daß ein signifikanter Unterschied zwischen Plasmen gesunder VP und Marcumar-Patienten besteht. Diese Signifikanz ist auch aus Abb. 9 ersichtlich, in der die aus jeweils 5 Einzelwerten berechneten Mittelwerte der 12 getesteten Plasmen dargestellt sind.

Die Bestimmung der Lysequote in Rel.% kann auch mit Hilfe eines Diagrammes sehr einfach durchgeführt werden. In Abb. 10 sind auf der Abszisse die Lysequote in Rel.% und auf der Ordinate die EW aufgetragen. Der Nullpunkt dieses Koordinatensystems stellt den 100%-Lysewert dar, der höchste

Lysequote von Plasmen gesunder Versuchspersonen (P) und von Marcumar-Patienten (M)



EW den 0%-Lysewert. Beide Bezugswerte werden durch eine Gerade miteinander verbunden. Der gesuchte Lysewert eines zu testenden Plasmas kann dadurch ermittelt werden, daß man den gemessenen EW auf dieser Geraden markiert und den Punkt auf die Abszisse projiziert. Die Lysequote in Rel.% kann nun direkt abgelesen werden.

4.5 Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase (SK)

Die Spontanpapierfibrinolyse soll bei der Überwachung der thrombolytischen Therapie akuter Gefäßverschlüsse praktische Anwendung finden. Deshalb schienen uns Modellversuche zur Aktivierung des Plasmas mit SK für geeignet, die Genauigkeit der von uns modifizierten Methode zu testen.

Für alle Testansätze wurde dasselbe Plasma verwendet. Streifen a ist mit nicht aktiviertem Plasma getränkt und dient als 0%-Lysewert.

Die Auswertung der Streifen erfolgte im "Eppendorf"-Photometer mit der Transparenz- und der Eluationsmethode.

Tabelle 10: Transparenzmethode

Str.	Extinktionswerte				$\bar{x}_i$	SK (E)	Lyse (Rel.%)
a	0,490	0,500	0,520	0,535	0,511	0	0
b	0,460	0,525	0,510	0,500	0,499	2	2,0
c	0,270	0,290	0,290	0,275	0,281	8	45,0
d	0,225	0,230	0,260	0,275	0,245	10	52,0
e	0,170	0,180	0,190	0,175	0,179	20	65,0
f	0,155	0,165	0,150	0,170	0,160	40	68,7

Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase

Transparenzmethode

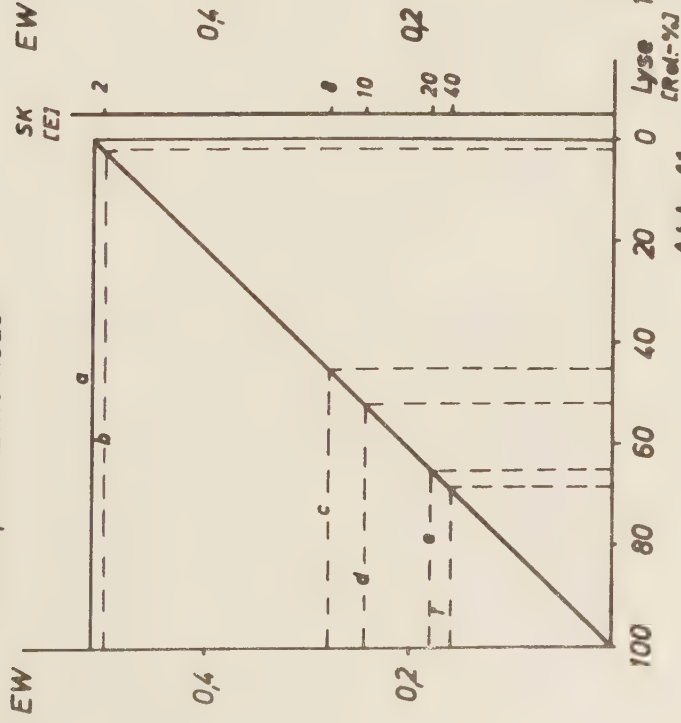


Abb: 11

Elutionsmethode

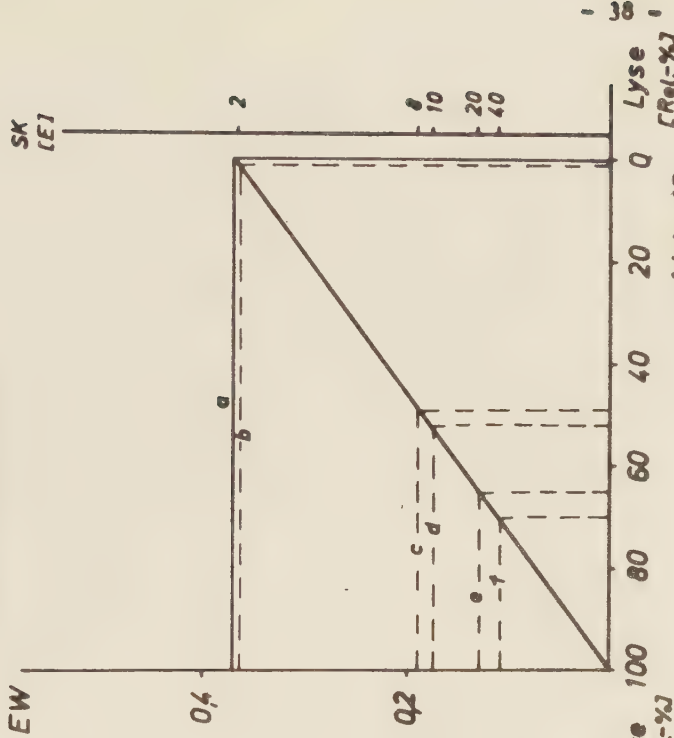


Abb: 12

Tabelle 11: Eluationsmethode

Str.	Extinktionswerte				$\bar{x}_i$	SK(E)	Lyse (Rel.%)
a	0,370	0,367	0,380	0,360	0,369	0	0
b	0,382	0,343	0,372	0,365	0,366	2	1,5
c	0,195	0,190	0,185	0,180	0,188	8	49,5
d	0,180	0,175	0,175	0,170	0,175	10	52,5
e	0,125	0,130	0,130	0,135	0,130	20	64,5
f	0,105	0,110	0,105	0,115	0,109	40	70,0

Die Steigerung der Lysequote nach der Aktivierung des Plasmas mit SK wird mit beiden Meßmethoden gut registriert. Die mit der Eluationsmethode gemessenen Werte dürften, wie frühere Versuche zeigten, genauer sein.

Die Abhängigkeit der Lysequote von den zugeführten SK-Einheiten ist deutlich erkennbar. Bei 2 Einheiten (E) SK beträgt die Lysequote nur 1,5% bzw. 2,0% und liegt damit im Bereich der Fehlergrenze; ab 8 (E) SK ist die Lysesteigerung bei diesem Plasma eindeutig meßbar (siehe auch Abb. 11 und 12).

4.6 Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase (SK) unter besonderer Berücksichtigung der Streptokinase-Resistenz.

In den folgenden Versuchen wurde vor der Aktivierung des Plasmas mit SK der Streptokinase-Resistenztest durchgeführt. In der Klinik wird nach dem Ergebnis dieses Testes die therapeutische SK-Initialdosis berechnet. Mit unseren Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob eine Relation zwischen SK-Resistenz (SKR) und zugeführten SK-Einheiten auch mit unserer Methode nachzuweisen ist.

Tabelle 12: Plasma A: SKR 240 000 E

Str.	SK (E)	Transparenzmethode		Eluatiionsmethode	
		EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)	EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)
a	0	0,465	0	0,312	0
b	10	0,305	34,3	0,215	31,2
c	50	0,250	46,2	0,175	44,0
d	100	0,165	64,5	0,120	61,6
e	500	0,115	75,3	0,087	72,2
f	1000	0,082	82,4	0,065	79,2
g	5000	0,058	87,5	0,045	85,8

Tabelle 13: Plasma B: SKR 240 000 E

Str.	SK (E)	Transparenzmethode		Eluatiionsmethode	
		EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)	EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)
a	0	0,470	0	0,350	0
b	2	0,460	2,5	0,350	0
c	4	0,450	4,2	0,330	5,8
d	6	0,410	12,8	0,305	13,0
e	8	0,400	15,0	0,300	14,2
f	10	0,335	28,6	0,240	31,4
g	50	0,145	69,2	0,100	71,4
h	100	0,085	81,9	0,060	82,9

Tabelle 14: Plasma C: SKR 80 000 F

Str.	SK (F)	Transparenzmethode		Eluatiionsmethode	
		EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)	EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)
a	0	0,475	0	0,350	0
b	10	0,220	53,7	0,150	57,5
c	50	0,135	71,6	0,100	72,0
d	100	0,115	76,0	0,085	76,5
e	500	0,040	91,5	0,035	90,5
f	1000	0,025	94,5	0,030	92,0

Tabelle 15: Plasma D: SKR 40 000 E

Str.	SK (E)	Transparenzmethode		Eluatiionsmethode	
		EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)	EW $\bar{x}_i$	Lyse (Rel.%)
a	0	0,485	0	0,360	0
b	10	0,170	65,0	0,120	66,7
c	50	0,095	80,2	0,070	80,5
d	100	0,088	82,0	0,065	82,0
e	500	0,075	84,4	0,050	86,0
f	1000	0,025	94,6	0,015	95,8

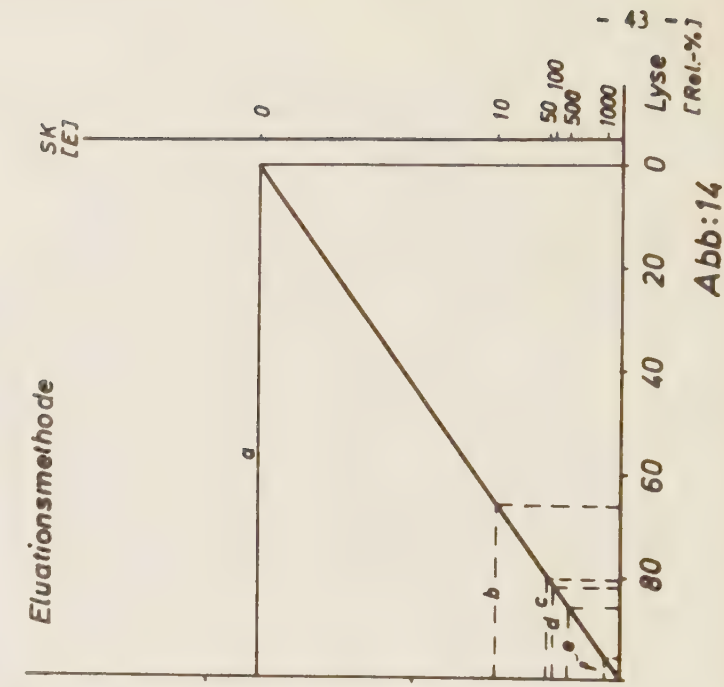
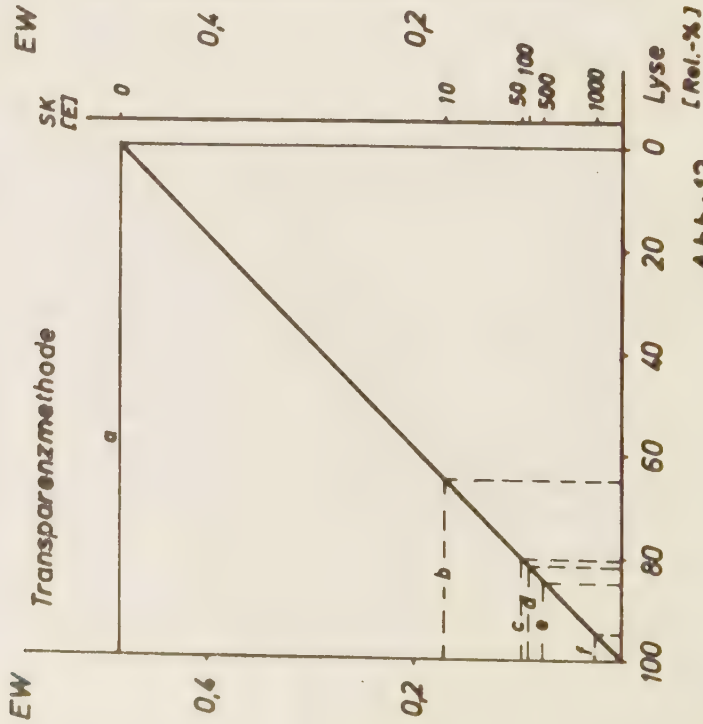
Tabelle 16: Beziehung zwischen Lysequote und Streptokinase-Resistenz - Eluationsmethode

1	2	3	4
SK (E)	SK-Resistenz		
	40 000	80 000	240 000
	% Lyse	% Lyse	% Lyse
0	0	0	0
10	67	58	31
50	81	72	44
100	82	77	62
500	(86)	91	72
1000	96	92	79

Der Streptokinase-Resistenztest wurde bei Plasmen von 4 Versuchspersonen bestimmt. Plasma A und B weisen eine Streptokinase-Resistenz (SKR) von 240 000 E, Plasma C und D von 80 000 bzw. 40 000 E auf. Wie aus den Tabellen 12 bis 15 hervorgeht, erfolgte die Aktivierung der Plasmen mit SK in steigenden Konzentrationen von 0 bis maximal 5000 E SK pro ml Plasma. Sowohl bei der Transparenz- als bei der Eluationsmethode wurden jeweils die Mittelwerte aus 4 Einzelbestimmungen in den Tabellen und in den zugehörigen graphischen Darstellungen wiedergegeben (siehe Abb. 13 bis 20).

Aus der Tabelle 16 geht hervor, daß bei der Aktivierung der Plasmen mit 10 E SK ein signifikanter Unterschied zwischen den Lysequoten besteht. Vergleicht man z.B. Spalte 2 mit Spalte 4, so werden mit 10 E SK bei einer SKR von 40 000 E 67% Lyse erhalten, bei einer SKR von 240 000 E nur 31%, d.h. die ver-

Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase SKR: 40 000 E



Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase SKR: 80 000 E

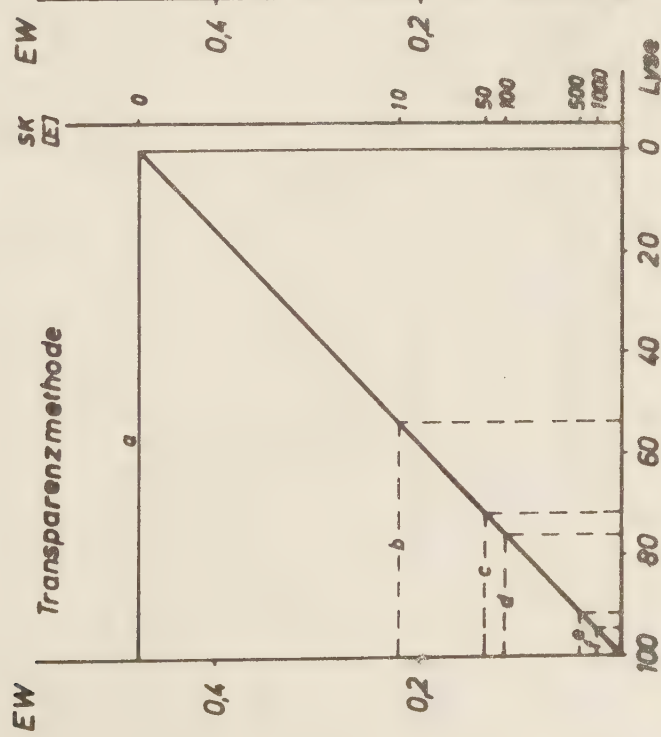


Abb:15

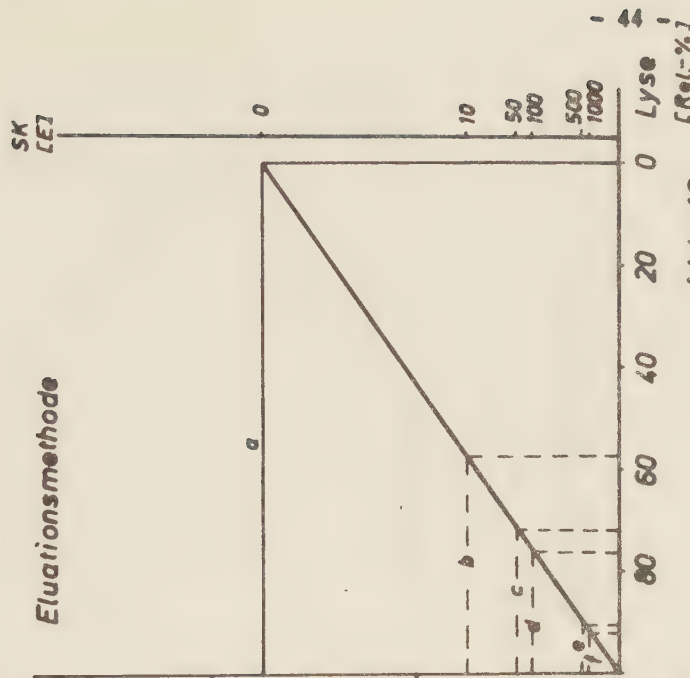
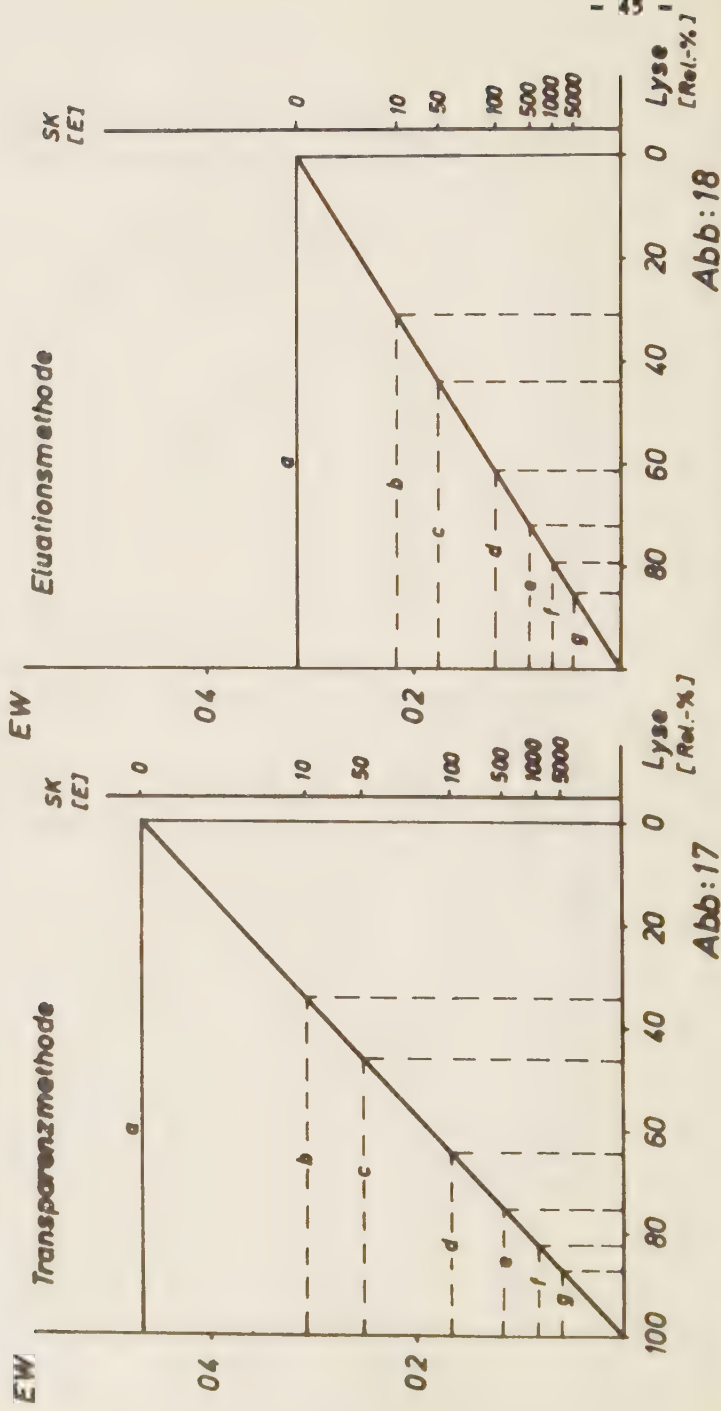


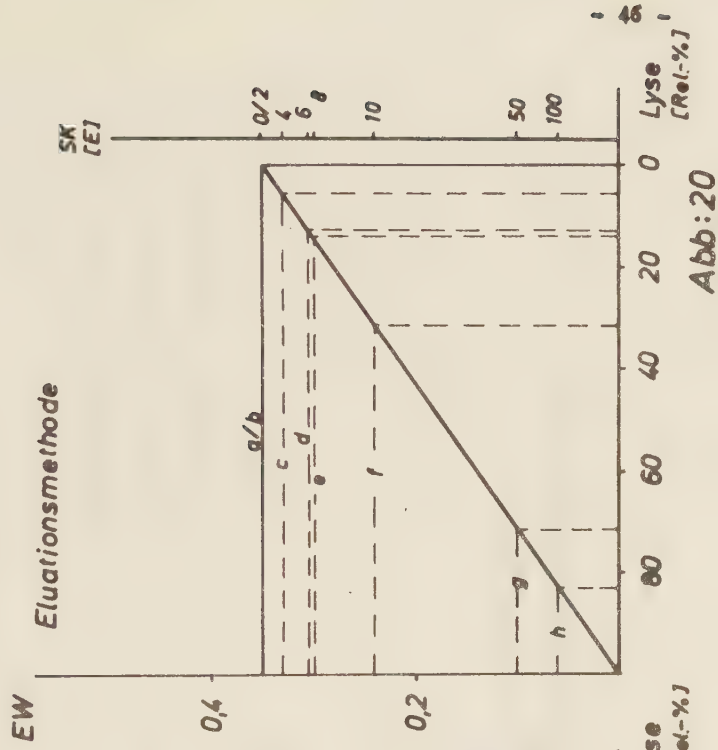
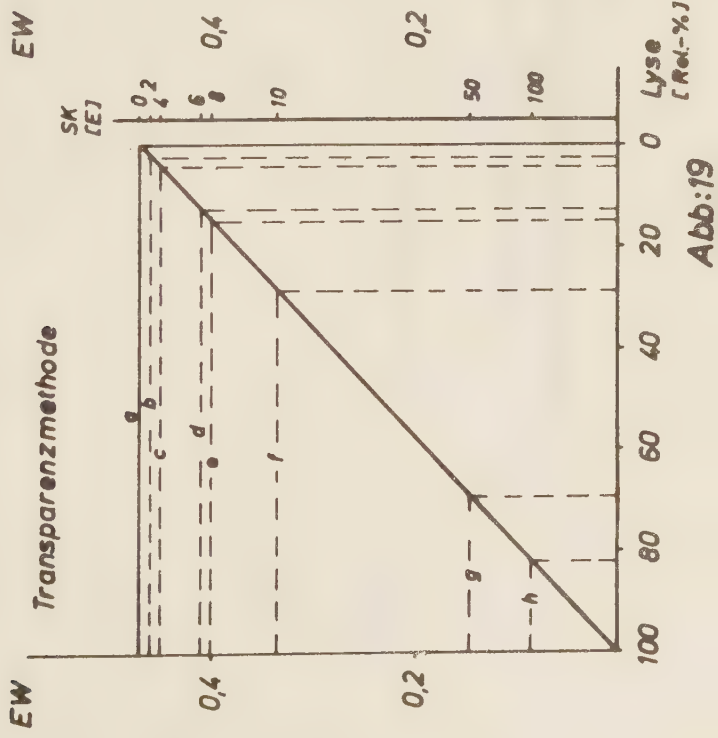
Abb:16

Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase SKR: 240 000 E



Aktivierung des Plasmas mit Streptokinase

SKR: 240 000 E



Beziehung zwischen Lysequote und Streptokinase-Resistenz

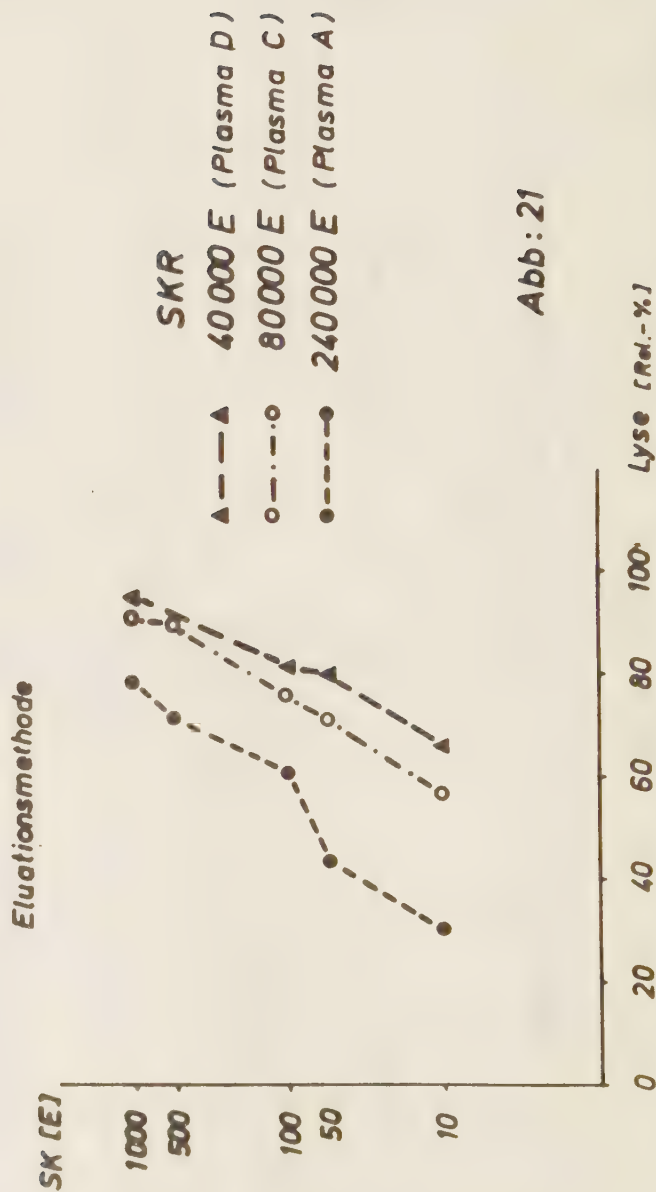


Abb: 21

mehrte Anwesenheit von Antistreptokinase im Plasma mit 240 000 E SKR drückt sich in einer um ca. 100% verminderten Lysequote aus gegenüber dem Plasma mit 40 000 E SKR. Dieser Befund korrespondiert mit der klinischen Erfahrung und beweist die Notwendigkeit der Resistenzbestimmung beim therapeutischen Vorgehen, zumindest bei der Verwendung von kleinen Aktivatordosen. Auch bei der Aktivierung mit 50 E SK pro ml Plasma bleibt dieses Verhältnis bestehen und erst bei hohen Dosen (etwa ab 500 E) nähern sich die Werte aneinander an. Die bei einer SKR von 80 000 E bestimmten Lysequoten befinden sich mehr in der Nähe der bei 40 000 E SKR erhaltenen Werte.

Abb. 21 zeigt den Zusammenhang zwischen Lysequote und zugeführten SK-Einheiten. Als Parameter ist die SKR gewählt. Der Verlauf der 3 Kurven ist annähernd parallel. Die SK (E) sind in logarithmischem Maßstab aufgetragen. Bei dem Lysewert (86) in Tabelle 16, Spalte 2, handelt es sich wahrscheinlich um eine Fehlbestimmung. Er wurde deshalb in die graphische Darstellung nicht aufgenommen.

Vergleicht man die mit der Transparenzmethode erhaltenen Werte mit denen der Elutionsmethode, so ergeben sich lediglich Differenzen, die im Fehlerbereich der Methode liegen.

5. Zusammenfassung

- (1) Eine neue Modifikation der von Goossens (69) inaugurierten Spontanpapierfibrinolyse-Bestimmungsmethode wird beschrieben und auf Fehlerquellen untersucht.
- (2) Durch Inkubation des Standard-Fibrinpapiers in einem definierten Plasma-Puffergemisch konnten wir die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessern.
- (3) Die Methode ist einfach und daher in jedem gut ausgestatteten Labor durchführbar.
- (4) Der Zeitaufwand wurde um 20 Stunden herabgesetzt, d.h. das Resultat steht nach 24 Stunden zur Verfügung. Die tatsächliche Arbeitszeit beträgt für 10 Bestimmungen etwa 4 Stunden.
- (5) Die eigentliche Messung kann mit 2 Methoden, der sog. Transparenz- und/oder der Eluationsmethode, erfolgen (beide vergleichbar mit der Auswertung bei der Elektrophorese). Wir ziehen die Eluationsmethode vor, weil die Meßergebnisse genauer sind und weil sie ein einfacheres und sauberes Arbeiten ermöglicht.
- (6) Der Fehler der Methode beträgt bei Mehrfachbestimmungen am gleichen Plasma für die Auswertung nach der Transparenzmethode $\pm 8,5\%$ und für die Auswertung nach der Eluationsmethode $\pm 6,3\%$.
- (7) Der Nachweis der Zuverlässigkeit der quantitativen Messungen im praktischen Bereich konnte u.a. an Plasmen, die mit steigenden Konzentrationen von Streptokinase aktiviert wurden, erbracht werden. Desgleichen stellten wir an Patientenblut mit unterschiedlicher Streptokinase-Resistenz korrelierende Beziehungen fest.

- (8) Bei 6 Patienten mit obliterierender Arteriopathie konnte während der Antikoagulantien-Dauertherapie mit Phenprocoumon (Marcumar) eine signifikante Zunahme der fibrinolytischen Aktivität beim Vergleich mit 6 gesunden Versuchspersonen nachgewiesen werden. Dieser Befund sollte an einer größeren Anzahl von Patienten überprüft werden.
- (9) Durch die Verwendung eines industriell hergestellten Standard-Fibrinpaniers können mit der Spontanpapierfibrinolyse quantitative, reproduzierbare und zwischen verschiedenen Laboratorien vergleichbare Werte erhalten werden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) MacFarlane, R.G. and Biggs, R.: Fibrinolysis, its mechanism and significance. *Blood*, 3:1167 (1948)
- (2) Dastre, A.: *Arch.Physiol.norm.path.*, 5:661 (1893)
- (3) Denys, J. et De Marbaix, H.: *Cellule*, 5:197 (1889)
- (4) Delezenne, C. et Pozerski, F.: *C.R.soc.biol. Paris*, 55:377 (1903)
- (5) Tillet, W.S. and Garner, R.L.: Fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J.exp.Med.*, 58:485 (1933)
- (6) Milstone, H.: *J.Immunol.*, 42:109 (1941)
- (7) Christensen, L.R. and MacLeod, C.M.: *J.gen.Physiol.*, 28:559 (1945)
- (8) Müllertz, S. and Lassen, M.: *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 82:264 (1953)
- (9) Kaplan, E.H.: Action of fibrinolysin (plasmin) on proteins. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 85:142 (1954)
- (10) Fearnley, G.R.: Fibrinolysis. Edward Arnold (Publishers) LTD, London (1965)
- (11) Astrup, T. and Müllertz, S.: The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch.Biochem. Biophys.*, 40:346 (1952)
- (12) Astrup, T. and Permin, P.M.: Fibrinolysis in the animal organism. *Nature*, 159:681 (1947)
- (13) Stamm, H.: Einführung in die Klinik der Fibrinolyse. S. Karger Verlag, Basel (1962)
- (14) Norman, Ph. S.: Studies of the plasmin system. II. Inhibition of plasmin by serum and plasma. *J.exp.Med.*, 108:53 (1958)
- (15) Deutsch, E. und Marschner, I.: Verhalten der Antiplasmin während der thrombolytischen Therapie.

- Experimentelle und therapeutische Fibrinolyse. F.K. Schattauer Verlag Stuttgart, S. 59 (1963)
- (16) Schwick, G.: Biochemie der Fibrinolyse. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 44, S. 103 (1964)
 - (17) Johnson, S.A. and Schneider, C.L.: The existence of antifibrinilysin activity in platelets. Science, 117:229 (1953)
 - (18) den Ottolander, G.J.H., Leijnse, B. and Cremer-Elfrink, H.M.J.: Plasmatic and platelet anti-plasmins and anti-activators. Thromb.Diathes.haemorrh. (Stuttgart), 18:404 (1967)
 - (19) Kunitz, M. and Northrop, J.H.: Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, trypsin-inhibitors etc. J.gen.Physiol., 19:991 (1936)
 - (20) Astrup, T.: Acta Physiol.Scand., 26:243 (1952)
 - (21) Kunitz, M.: Crystalline soybean trypsin inhibitor. J.gen.Physiol., 30:291 (1947)
 - (22) Boudreaux, H.B., Frampton, V.L.: A peanut factor for haemostasis in haemophilia. Nature (Lond.), 185:469 (1960)
 - (23) Marx, R.: Blutstillung mit Fibrinolyseinhibitoren. Münch.med.Wschr., 108:1267 (1966)
 - (24) Lohmann, K., Markwardt, F. and Landmann, H.: Thrombos. Diathes.haemorrh. (Stuttgart), 10:424 (1964)
 - (25) Sundermann, A.: Fibrinolytische Blutungen und ihre Behandlung durch p-Amino-methylbenzoesäure. Verh. dtsh.Ges.inn.Med., 71:749 (1965)
 - (26) Astrup, T. and Albrechtsen, O.K.: Estimation of the plasminogen activator and the trypsin inhibitor in animal and human tissues. Scand.J.Clin.Laborat.Invest., 9:233 (1957)
 - (27) Albrechtsen, O.K.: The fibrinolytic activity of human tissues. Brit.J.Haemat., 3:284 (1957)

- (28) Astrup, T. and Sterndorff, J.: A fibrinolytic system in human milk. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 84:605 (1953)
- (29) Albrechtsen, O.K. and Hess-Thaysen, J.: Fibrinolytic activity in human saliva. *Acta physiol.scand.*, 35:138 (1955)
- (30) Storm, O.: Fibrinolytic activity in human tears. *Scand. J.clin.Lab.Invest.*, 7:55 (1955)
- (31) Astrup, T. and Sterndorff, J.: An activator of plasminogen in normal urine. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 81:675 (1952)
- (32) Painter, R.H. and Charles, A.F.: Characterization of a soluble plasminogen activator from kidney cell cultures. *Amer.J.Physiol.*, 202:1125 (1962)
- (33) Williams, J.R.B.: The fibrinolytic activity of urine. *Brit.J.exp.Path.*, 32:530 (1951)
- (34) Lesuk, A., Terminiello, L. and Traver, J.H.: *Science*, 147:3660 (1965)
- (35) Hess, H. und Goossens, N.: Behandlung rezidivierender Embolien in Extremitätenarterien mit Streptokinase und Urokinase. *Fortschr.Med.*, 84:296 (1966)
- (36) Weiner, M., Redisch, W. and Steele, J.M.: Occurrence of fibrinolytic activity following administration of nicotinic acid. *Proc.Soc.exp.Biol.Med.*, 98:755 (1958)
- (37) Imhof, P., Imhof, M., Eichenberger, E. und Lauener, H.: Über die Aktivierung der Fibrinolyse durch Verabreichung von Nikotinsäure. *Schweiz.med.Wschr.*, 89:736 (1959)
- (38) Deutsch, E. und Fischer, M.: Medikamentös induzierte Fibrinolyse. *Verh.dtsch.Ges.inn.Med.*, 66:1012 (1960)
- (39) Egli, H. und Klensch, H.: Zur Fibrinolyse- und Kreislaufwirkung der Nikotinsäure unter besonderer Berücksichtigung ihrer therapeutischen Anwendbarkeit. *Med.Welt*, 41:2108 (1961)
- (40) Sailer, S.: Die Fibrinolyse und ihre therapeutische

Anwendung bei thromboembolischen Erkrankungen.

Fortschr.d.Med., 80:775 (1962)

- (41) Goossens, N.: Über Fibrinolyseaktivierung *in vitro* und *in vivo* durch Nikotinsäure, Heparin und deren Mischungen. Med.Welt, 14:899 (1967)
- (42) Westnhil, O. und Lüderitz, O.: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien. Angew.Chem., 66:407 (1954)
- (43) Eichenberger, E. und Schönholzer, G.: Verh.dtsch.Ges. inn.Med., 62. Kongress 1956, S. 201
- (44) Stamm, H.: Therapeutische Fibrinolyse und Thrombolyse. V.Hamb. Symposion über Blutgerinnung. F.K.Schattauer Verlag (Stuttg.) 1963, S. 197
- (45) Deutsch, E.: Fortschritte der fibrinolytischen Therapie. Blut, 7:472-499 (1961)
- (46) Deutsch, E., Eilsner, P. und Fischer, M.: Medikamentös induzierte Fibrinolyse. Wiener Zschr.f.inn.Med., 41:457 (1960)
- (47) Marx, R. und Schmidt, H.: Über den Einfluß von Anti-coagulantien auf die Fibrinolyse im menschlichen Serum. Ärztl.Forsch., 5:I/192 (1951)
- (48) Witte, S., Klein, H.O. und Gerathewohl, H.: Zur Frage einer gleichzeitigen Anwendung von Antikoagulantien und Theophyllinnikotinat. Med.Klin., 60:1046 (1965)
- (49) Sandritter, W., Benstz, W., Schlüter, G. und Kleinschmidt, A.K.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Thrombolyse und Thrombosenprophylaxe mit Nikotinsäure und Heparin. Med.Welt, 31:1613 (1962)
- (50) Halse, Th.: Aktivierung der Fibrinolyse und Thrombolyse durch Polysaccharidschwefelsäureester (Heparin, Heparinoide). Arzneimittelforschung 12:574 (1962)
- (51) Sailer, S. und Eber, O.: Über Thrombolyseversuche an Kaninchen mit einer kombinierten Nicotinsäure-Heparinbehandlung. Klin.Wschr. 38:548 (1960)

- (52) Rasche, H. und Hiemeyer, V.: Zur Frage der thrombolytischen Wirkung von Heparin und Nikotinsäure. Med.Klin., 63:63 (1968)
- (53) Halse, Th.: Zschr.f.Vitamin-, Hormon- und Fermentforschung, 11:1 (1960)
- (54) Astrup, T.: Fibrinolysis in the organism. Blood, 11:781 (1956)
- (55) Heimbürger, N.: Theorie der generellen Plasminogenaktivierung durch Streptokinase. Symposion d.dtsch.Ges. f.Angiologie, München 27.u.28.Okt.1966. F.K.Schattauer-Verlag (Stuttg.) 1967, S. 7-10
- (56) Witte, S.: Indikationen und praktische Ausführung der fibrinolytischen Behandlung mit Streptokinase. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 44, S. 33 (1964)
- (57) Schmützler, R.: Erfolgsbeurteilung der thrombolytischen Therapie. Behringwerk-Mitteilungen, Heft 44, S. 133 (1964)
- (58) Back, N., Ambrus, J.L., Simpson, C.L. and Shulman, S.: Study on the effect of streptokinase activated Plasmin (Fibrinolysin) on clots in various stages of organisation. J.clin.Invest., 37:864 (1958)
- (59) Hess, H.: Thrombolytische Therapie. Symposion d.dtsch. Ges.f.Angiologie. F.K.Schattauer-Verlag (Stuttg.) 1967, S. 104-108
- (60) Sailer, S. und Eber, O.: Klin.Wschr., 41:212 (1963)
- (61) Sailer, S., Wehrschütz, E. und Tilz, G.P.: Die thrombolytische Behandlung peripherer Gefäßverschlüsse mit Streptokinase. Wiener med.Wschr., 118:73 (1968)
- (62) Körtge, P.: Die thrombolytische Therapie. Dtsch.med.J., 18:225 (1967)
- (63) Bross, W., Kozuszek, W., Masiak, M. und Kalembe, J.: Die Behandlung akuter thromboembolischer Gefäßverschlüsse mit therapeutisch induzierter Fibrinolyse. Med.Klin., 62:755 (1967)

- (64) van de Loo, J. und Gross, R.: Blutgerinnung und Fibrinolyse. Med.Univ.-Klinik Köln, 1965, S. 44-48
- (65) Lassen, M.: Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. Acta physiol.scand., 27:371 (1952)
- (66) von Kaulla, K.N. and Schultz, R.L.: Methods for the evaluation of human fibrinolysis. Amer.J.clin.Path., 29:1041 (1958)
- (67) Hartert, H.: Die Thrombelastographie. Eine Methode zur physikalischen Analyse des Blutgerinnungsvorganges. Z.ges.exp.Med., 117:189 (1951)
- (68) Goossens, N. und Walcher, A.: Proc. of the IX. Congr. of the Internat. Soc. of Hematol., Vol. II, (Mexico) 1962:271, S. Karger Verlag (1963)
- (69) Goossens, N.: Spontaneous Paperfibrinolysis, XI. Congr. of the Internat. Soc. of Hematol., Sydney 1966
- (70) Zantl, H.: Fibrinolysebestimmungsmethoden und Fibrinolyseaktivierung durch Heparin und Nikotinsäure. Med. Diss. München 1966
- (71) Sibos, J.: Zur Methode der Spontanpapierfibrinolyse. Med. Diss. München 1967
- (72) Graf, U. und Henning, H.J.: Formeln und Tabellen der mathematischen Statistik. Springer-Verlag, 3.Aufl. 1960

Lebenslauf

Ich, Brigitte Hannelore Schorer, geborene Schlegel, wurde am 17. Juli 1940 als einziges Kind des praktischen Arztes Hermann Schlegel und seiner Ehefrau Hedwig, geborene Graf, in Donauwörth geboren. Im April 1945 kam mein Vater bei einem Fliegerangriff in Donauwörth ums Leben.

Die Volksschule besuchte ich in Wollishausen bei Augsburg und in Hilzingen bei Singen am Hohentwiel, das Realgymnasium bis zur 4. Klasse in Singen, anschließend das Institut der Englischen Fräulein in Augsburg, wo ich im Juli 1959 die Reifeprüfung ablegte.

Im WS 1959/60 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximiliansuniversität in München, wo ich 1962 das Physikum und 1966 das Staatsexamen bestand. Im April 1967 heiratete ich den Diplom-Ingenieur Herbert Schorer.

Nach Abschluß der Medizinalassistentenzeit erhielt ich im März 1970 die Approbation als Ärztin.

